

Aufreinigung und Charakterisierung der RNase P in *Aquifex aeolicus*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich

Pharmazeutische Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Astrid Ingeborg Nickel

aus Ratzeburg

Marburg/Lahn 2014

Vom Fachbereich Pharmazeutische Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 27.05.2014 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland K. Hartmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Rossmann

Tag der mündlichen Prüfung am: 28.05.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I-VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Ribonuklease P.....	1
1.1.1 Die RNase P RNA.....	1
1.1.2 RNase P Proteine.....	2
1.2 Formen der RNase P in den drei Domänen des Lebens.....	3
1.2.1 Die bakterielle RNase P.....	3
1.2.2 Die archaeale RNase P.....	4
1.2.3 Die RNase P in Eukaryonten.....	4
1.2.3.1 Die nukleäre eukaryontische RNase P.....	4
1.2.3.2 Eukaryontische RNase P in Chloroplasten.....	4
1.2.3.3 Eukaryontische RNase P in Mitochondrien.....	5
1.2.3.3.1 Mitochondriale RNase P in Hefe.....	5
1.2.3.3.2 Mitochondriale RNase P in Pflanzen.....	5
1.2.3.3.3 RNase P in humanen Mitochondrien.....	5
1.2.4 Protein-basierte RNase P.....	6
1.3 Enzym-Substrat-Wechselwirkungen.....	7
1.4 Der Katalyse-Mechanismus der Prä-tRNA-Prozessierung.....	9
1.5 <i>Aquifex aeolicus</i>.....	10
2 ZIELSETZUNG.....	12
3 MATERIAL UND METHODEN.....	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 <i>Aquifex aeolicus</i> Zellen.....	14
3.1.2 Verwendete Bakterienstämme.....	14
3.1.3 Verwendete Plasmidvektoren.....	14
3.1.3.1 Plasmide als Templat für <i>in vitro</i> Transkriptionen.....	14
3.1.3.2 Plasmide für die Herstellung von Proteinen.....	14
3.1.4 Primer.....	15
3.1.4.1 Primer zur Herstellung nicht-kodierender RNAs aus <i>A. aeolicus</i>	15
3.1.4.2 Primer für eine putative RNase P RNA aus <i>A. aeolicus</i>	16
3.1.5 Synthetische Oligonukleotide.....	16
3.1.6 LNA-Sonden.....	16
3.1.7 Enzyme.....	17

Inhaltsverzeichnis

3.1.8	Antikörper	17
3.1.9	Größenmarker	17
3.1.9.1	Größenmarker für DNA	17
3.1.9.2	Größenmarker für RNA	17
3.1.9.3	Größenmarker für Proteine	17
3.1.9.4	Kalibrierproteine für die Gelchromatographie-Säule	17
3.1.10	Kits	17
3.1.11	Chemikalien.....	18
3.1.12	Puffer und Lösungen	20
3.1.12.1	Allgemeines zur Herstellung.....	20
3.1.12.2	Verzeichnis verwendeter Puffer und Lösungen.....	20
3.1.13	Geräte und Verbrauchsmaterial	21
3.1.14	Programme, Software und Datenbanken	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Allgemeine bakterielle Zellkulturarbeiten.....	24
3.2.1.1	Bakterienanzucht in Flüssigmedium.....	24
3.2.1.1.1	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	24
3.2.1.2	Bakterienanzucht auf festen Medien	24
3.2.1.3	Präparation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	24
3.2.1.4	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	25
3.2.2	Allgemeine Nukleinsäuretechniken	25
3.2.2.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	25
3.2.2.2	Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren	26
3.2.2.2.1	Ethanol-Fällung	26
3.2.2.2.2	Isopropanol-Fällung.....	26
3.2.2.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	26
3.2.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.2.2.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), denaturierend	27
3.2.2.4	Detektion von Nukleinsäuren in Gelen	28
3.2.2.4.1	Ethidiumbromid-Färbung.....	28
3.2.2.4.2	UV-Detektion	28
3.2.2.4.3	Autoradiographie	29
3.2.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
3.2.3	DNA-Methoden.....	30
3.2.3.1	Plasmidpräparation	30

Inhaltsverzeichnis

3.2.3.2	Restriktionsverdau.....	30
3.2.3.3	DNA-Aufreinigung	30
3.2.3.3.1	Aufreinigung genomischer DNA	30
3.2.3.3.2	Agarosegel-Elution	31
3.2.3.4	Polymerasekettenreaktion.....	31
3.2.3.4.1	Standard-PCR	31
3.2.3.4.2	Amplifikation GC-reicher DNA.....	32
3.2.4	RNA-Methoden.....	32
3.2.4.1	Total RNA-Extraktion.....	32
3.2.4.2	<i>In vitro</i> Transkription.....	32
3.2.4.2.1	<i>In vitro</i> Transkription GC-reicher RNAs.....	34
3.2.4.3	RNA-Aufreinigung mittels PAA-Gelelektrophorese	34
3.2.4.3.1	PAA-Gelelution.....	34
3.2.4.4	Dephosphorylierung	35
3.2.4.5	Phosphorylierung	35
3.2.4.5.1	Radioaktive Markierung von RNA	35
3.2.4.6	RNA-Präparationen	36
3.2.4.6.1	Präparation der <i>E. coli</i> RNase P RNA.....	36
3.2.4.6.2	Präparation der Prä-tRNA ^{His}	36
3.2.4.6.3	Präparation der 6S-1 RNA	36
3.2.4.7	Northern Blot-Analyse nicht-kodierender RNAs in <i>A. aeolicus</i>	36
3.2.4.7.1	Gelelektrophorese und Blotting	37
3.2.4.7.2	Hybridisierung und Detektion	37
3.2.4.7.3	Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen	38
3.2.4.7.4	Herstellung der Sonden.....	39
3.2.4.7.5	Herstellung der Größenmarker.....	39
3.2.4.8	Micrococcal Nuclease-Behandlung mit Träger-RNA.....	39
3.2.4.9	Micrococcal Nuclease <i>Rescue</i> -Experiment.....	40
3.2.5	Protein-Methoden.....	41
3.2.5.1	SDS-Gelelektrophorese	41
3.2.5.1.1	SDS-Stufengradientengel.....	42
3.2.5.2	Proteingel-Färbung.....	43
3.2.5.2.1	Färbung mit kolloidalem Coomassie	43
3.2.5.2.2	Massenspektrometrie-kompatible Silberfärbung	44
3.2.5.3	Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analyse	44

Inhaltsverzeichnis

3.2.5.3.1	Vorbereitung von Gelstücken	44
3.2.5.3.2	Vorbereitung von Flüssigproben	45
3.2.5.4	Dialyse.....	45
3.2.5.4.1	Mini-Dialyse.....	45
3.2.5.5	Proteinbestimmung nach Bradford.....	46
3.2.5.6	Ankonzentrierung	46
3.2.5.7	Präparation von Proteinen.....	47
3.2.5.7.1	PRORP1-Präparation.....	47
3.2.5.7.2	Präparation des RNase P Proteins von <i>B. subtilis</i>	47
3.2.6	RNA-Protein-Methoden	48
3.2.6.1	Präparation von <i>B. subtilis</i> RNase P Holoenzym	48
3.2.6.2	Enzymtest auf RNase P-Aktivität	49
3.2.6.2.1	Enzym-Mix: Zusammensetzung und Präinkubation	50
3.2.6.2.2	Substrat-Mix: Zusammensetzung und Präinkubation.....	50
3.2.6.3	Kinetische Untersuchung der <i>A. aeolicus</i> RNase P-Aktivität	51
3.2.6.4	Prozessierung der <i>E. coli</i> Prä-tRNA ^{His}	51
3.2.6.5	<i>Aquifex aeolicus</i> RNase P-Holoenzymrekonstitution	51
3.2.6.5.1	Vorversuch	51
3.2.6.5.2	RNase P-Holoenzymrekonstitution	52
3.2.7	Aufreinigung	53
3.2.7.1	Zellaufschluss.....	53
3.2.7.1.1	Zellaufschluss mittels Sonifizierung	53
3.2.7.1.2	Zellaufschluss mittels French Press.....	53
3.2.7.2	Fast performance liquid chromatography (FPLC)	54
3.2.7.2.1	Anionenaustausch-Chromatographie.....	55
3.2.7.2.2	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC).....	56
3.2.7.2.3	Größenausschluss-Chromatographie (Gelchromatographie)	58
3.2.7.3	RNA- und Protein-Extraktion aus aufgereinigtem <i>A. aeolicus</i> Lysat	59
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	61
4.1	Mehrstufige Aufreinigungsmethode	
	zur Anreicherung der RNase P aus <i>Aquifex aeolicus</i>.....	61
4.1.1	Zellaufschluss.....	61
4.1.2	Anionenaustausch-Chromatographie.....	61
4.1.3	Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....	63
4.1.4	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC).....	64

Inhaltsverzeichnis

4.1.4.1	Vorversuche zur Hydrophoben Interaktions-Chromatographie	64
4.1.4.1.1	Proben-Ankonzentrierung	64
4.1.4.1.2	Ammoniumsulfatfällung	65
4.1.4.1.3	Test hydrophober Matrices.....	66
4.1.4.1.4	Mini-Dialyse.....	67
4.1.4.2	Optimierung der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie	67
4.1.4.3	Fazit der Entwicklung des HIC-Aufreinigungsschritts.....	67
4.1.5	Größenausschluss-Chromatographie	68
4.1.5.1	Vorversuche zur Größenausschluss-Chromatographie	68
4.1.5.1.1	Ausschlussverfahren mittels Zentrifugations-Filtereinheiten	68
4.1.5.1.2	Test von Chromatographiematerialien für die Größenausschluss-Chromatographie	69
4.1.5.1.3	Kalibrierung der Superose 6-Säule	69
4.1.5.1.4	Optimierung der Größenausschluss-Chromatographie.....	70
4.1.5.2	Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 4-Eluaten.....	71
4.1.5.3	Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 3-Eluaten.....	72
4.1.6	RNA-Isolation aus aufgereinigtem <i>A. aeolicus</i> Lysat	73
4.2	RNA-allein Reaktionen.....	75
4.3	Rekonstitution von <i>A. aeolicus</i> RNase P aus RNA- und Protein-Komponenten.....	75
4.3.1	Heterologe Rekonstitutionen von <i>A. aeolicus</i> RNase P	78
4.4	Micrococcal Nuclease-Behandlung RNase P-aktiver <i>A. aeolicus</i>-Fraktionen	79
4.4.1	<i>Rescue</i> Experiment: Regeneration der <i>A. aeolicus</i> RNase P-Aktivität nach Micrococcal Nuclease-Behandlung	81
4.5	RNA-Seq-Analysen.....	81
4.5.1	Sequenzierte Proben.....	81
4.5.2	Sequenzierung und Analyse-Parameter	82
4.5.3	Ergebnisse der RNA-Analyse.....	83
4.5.3.1	Vorkommen der analysierten RNAs innerhalb der <i>Aquificales</i>	84
4.5.3.2	Anreicherung nicht-kodierender RNAs in RNase P-angereicherten Extrakten	85
4.5.4	Fazit der RNA-Sequenzierung	86
4.6	Untersuchung einer putativen <i>A. aeolicus</i> P RNA auf RNase P-Aktivität.....	87
4.6.1	Test auf RNA-allein Aktivität.....	87
4.6.2	RNA-Komplementation partiell gereinigter Extrakte.....	88

Inhaltsverzeichnis

4.6.3	Kombination der putativen P RNA mit <i>B. subtilis</i> RNase P Protein.....	89
4.6.4	Kombination der putativen P RNA mit dem <i>B. subtilis</i> RNase P Holoenzym	89
4.6.5	Ergebnis der Untersuchungen der putativen <i>A. aeolicus</i> RNase P RNA	89
4.7	Proteinanalyse	90
4.7.1	Analyse von Flüssigproben	90
4.7.1.1	Auswertungsparameter der Flüssigproben-Analyse	91
4.7.1.2	Quantitative Auswertung der Flüssigproben-Analyse	92
4.7.1.3	Analyse von Struktur-Domänen	93
4.7.1.4	Vorkommen der Proteine innerhalb der <i>Aquificales</i>	95
4.7.1.5	Fazit der Flüssigproben-Analyse.....	96
4.7.2	Analyse ausgeschnittener Protein-Gelbanden	97
4.8	5'-Prozessierung von Histidyl-tRNA in <i>A. aeolicus</i>.....	100
4.9	Nicht-kodierende RNAs und <i>antisense</i> RNAs in <i>A. aeolicus</i>	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	AUSBLICK.....	106
7	ANHANG.....	107
7.1	Abkürzungen und Einheiten.....	107
7.1.1	Abkürzungen	107
7.1.2	Präfixe vor Einheiten:	110
7.2	Literaturverzeichnis	111
7.3	Eigene Publikationen und Tagungsbeiträge	119
7.3.1	Veröffentlichungen	119
7.3.2	Posterpräsentationen	119
7.4	Genomewide comparison and novel ncRNAs of <i>Aquificales</i>	120
7.5	Deep Sequencing (RNA-Seq)-Datenauswertung.....	137
7.6	Massenspektrometrie-Datenanalyse	146
7.7	2D-Strukturvorhersage einer putativen <i>A. aeolicus</i> P RNA	156
DANKSAGUNG		157
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG		159

1 Einleitung

1.1 Ribonuklease P

Transfer-RNAs (tRNAs) werden, bevor sie an der Proteinbiosynthese mitwirken können, in fast allen Organismen als Vorläufermoleküle (Prä-tRNAs) synthetisiert. Nach der Transkription von Prä-tRNAs werden im Verlauf der Reifung zu muren tRNAs Sequenzen abgespalten, die das 5'- und das 3'-Ende flankieren, Introns werden entfernt, Basen modifiziert und das 3'-CCA-Ende wird angefügt. Die Ribonuklease P (RNase P) wurde als das Enzym identifiziert, welches durch endonukleolytische Abspaltung der 5'-flankierenden Sequenz die 5'-Prozessierung von Prä-tRNAs in Bakterien vollführt (Robertson *et al.* 1972). Die RNase P besteht in allen drei Domänen des Lebens meistens aus einer RNA-Untereinheit, die zusammen mit einer bis zehn Protein-Untereinheiten ein Ribonukleoprotein bildet, wobei bakterielle RNase P eine, die archeale RNase P vier bis fünf und die eukaryontische RNase P neun bis zehn Protein-Untereinheiten aufweisen. Später wurde nachgewiesen, dass die RNA-Untereinheit des Ribonukleoproteins die katalytische Untereinheit ist (Guerrier-Takada *et al.* 1983), (Pannucci *et al.* 1999), (Kikovska *et al.* 2007). Kürzlich konnten dann auch RNase P-Enzyme identifiziert werden, die ausschließlich aus Protein-Komponenten bestehen. So besteht humane mitochondriale RNase P beispielsweise aus drei Proteinkomponenten (Holzmann *et al.* 2008) und RNase P aus *Arabidopsis thaliana* (Gobert *et al.* 2010), (Gutmann *et al.* 2012) oder *Trypanosoma brucei* (Taschner *et al.* 2012) ist ein singuläres Proteinenzym. Diese Befunde unterstützen die Theorie, dass die Evolution von einer RNA-Welt ausgegangen ist. Ausgehend von einer hypothetisch einzelnen katalytischen RNA wuchs die Anzahl der Protein-Untereinheiten und deren Funktion in der RNase P. Enzymatisch aktive Moleküle, in denen eine RNA die katalytisch aktive Komponente ist, werden als Ribozyme bezeichnet. Weitere bedeutsame Ribozyme neben der RNase P sind zum Beispiel das Ribosom und die selbstspaltenden Introns der Gruppe I und II sowie *Hammerhead*-Ribozyme. Viele Ribozyme sind intramolekular katalytisch aktiv (*cis*-aktiv). Von allen natürlich vorkommenden Ribozymen sind die RNA-basierte RNase P und das Ribosom die einzigen Ribonukleoproteine, die *in vivo* eine Reaktion *in trans* durchführen. Neben Vorläufer-tRNAs prozessiert die RNase P aber auch noch andere RNA-Moleküle: Die Transfer-Messenger RNA (tmRNA), die eine tRNA-ähnliche Struktur hat, wird auf die gleiche Weise als Substrat von der RNase P erkannt wie Prä-tRNAs (Komine *et al.* 1994). Das Gleiche gilt für die 4.5 S RNA, bei der Strukturdomänen denen eines coaxial gestapelten tRNA-Akzeptor-/T-Stamms ähnlich sind (Bothwell *et al.* 1976a), (Peck-Miller and Altman 1991). Weitere nicht-tRNA-Substrate der RNase P sind unter anderem *riboswitches* (Seif and Altman 2008), intergenische Regionen polycistronischer Operons (Li and Altman 2004b), (Alifano *et al.* 1994) und virale RNAs (Bothwell *et al.* 1976b), (Hartmann *et al.* 1995), (Forti *et al.* 1995).

1.1.1 Die RNase P RNA

Die RNase P RNAs (P RNAs) von Bakterien, Archaeen und Eukaryonten haben konservierte strukturelle Gemeinsamkeiten. Die Analyse von P RNAs aus allen drei Domänen des Lebens ergab, dass allen P RNAs ein strukturell konservierter Kern mit ähnlicher Sekundärstruktur gemeinsam ist (Brown *et al.* 1996), (Frank *et al.* 2000), (Harris *et al.* 1994), (Harris *et al.*

2001). Anhand der Sekundärstrukturen werden die P RNAs in zwei Haupt-Typen eingeteilt: P RNAs vom Typ A und P RNAs vom Typ B. Ein Vertreter des Typs A („ancestral“) ist die *Escherichia coli* P RNA, während die *Bacillus subtilis* P RNA dem Typ B („*Bacillus*“) zugeordnet wird. Alle bakteriellen P RNAs sind homolog und haben eine minimale Konsensusstruktur (Kernstruktur) gemeinsam, die alle Elemente zur Substraterkennung und Katalyse beinhaltet und ausreichend ist, um Prä-tRNAs zu prozessieren (Waugh *et al.* 1989). Fünf Regionen wurden als universell konserviert identifiziert: Sie heißen „*Conserved region*“ (CR) I – V und sind durch stark konservierte Basenabfolgen bzw. -positionen charakterisiert. Desweiteren ist die RNase P RNA aus zwei unabhängig gefalteten Domänen aufgebaut (Loria and Pan 1996), (Pan 1995). Die größere der beiden Domänen, die katalytische Domäne (C-Domäne), katalysiert die Hydrolyse der 5'-Nukleotidflanke. Sie umfasst die konservierten Regionen CR I, CR IV und CR V. Die kleinere Spezifitäts-Domäne (S-Domäne) ist an der Substraterkennung beteiligt. Sie beinhaltet die konservierten Regionen CR II und CR III.

1.1.2 RNase P Proteine

Die Anzahl der RNase P Proteine variiert zwischen einer Protein-Untereinheit bei Bakterien bis zu zehn Protein-Untereinheiten bei eukaryontischen RNase P-Enzymen. Bis zur Strukturaufklärung eines bakteriellen Holoenzym in Komplex mit einer tRNA (Reiter *et al.* 2010) war die Funktion des Proteins bei der tRNA-Maturierung biochemisch untersucht worden und es gab viele Belege für Protein-Substrat-Interaktionen (Niranjana Kumari *et al.* 1998b), (Kurz *et al.* 1998). Die Holoenzymstruktur bestätigt einen direkten Kontakt der Protein-Untereinheit mit der 5'-Nukleotidflanke und damit die zentrale Rolle der Protein-Untereinheit für die Substraterkennung (Reiter *et al.* 2010). Eine direkte Beteiligung des P Proteins an der Katalyse wird aber nicht in Betracht gezogen, da P RNAs alleine katalytisch aktiv sind und die veröffentlichte Struktur keinen Hinweis darauf liefert. P Proteine können aber neben einer Erhöhung der Substrataffinität (Kurz *et al.* 1998) die katalytische Effizienz steigern (Crary *et al.* 1998). Außerdem reduzieren sie *in vitro* die Konzentration divalenter Metallionen, die für die tRNA-Prozessierung erforderlich ist (Guerrier-Takada *et al.* 1983), (Guerrier-Takada and Altman 1984), (Gardiner *et al.* 1985). Am besten sind bakterielle RNase P Proteine untersucht. Über die Rolle von archaealen und eukaryontischen P Proteinen ist weniger bekannt. Es wird vermutet, dass die höhere Anzahl an P Proteinen in archaealen und eukaryontischen RNase P Holoenzymen die Faltung der P RNA stabilisiert und fehlende Sekundärstrukturelemente der P RNA kompensiert (Marvin and Engelke 2009), (Jarrous and Gopalan 2010). Es wird auch diskutiert, dass ein größerer Proteinanteil eine größere Substratvielfalt ermöglicht und bei höherer Zellkomplexität für die Lokalisierung der RNase P erforderlich ist (Marvin and Engelke 2009).

1.2 Formen der RNase P in den drei Domänen des Lebens

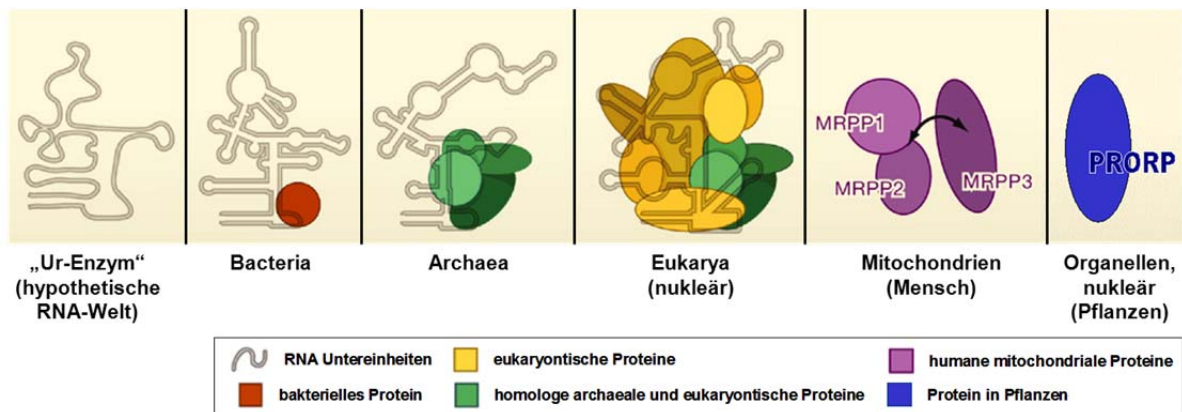


Abbildung 1.1: „The Evolution of RNase P“, modifiziert nach Walker und Engelke 2008. Darstellung der Zusammensetzung von RNase P-Enzymen, welche die Theorie widerspiegelt, dass die Evolution von einer RNA-Welt ausgegangen ist. Unter der Annahme, dass die ursprünglichste Enzym-Form lediglich aus einer katalytischen RNA bestand, stieg die Anzahl der Protein-Untereinheiten und derer Funktion in den RNA-abhängigen RNase P-Enzymen der drei Domänen des Lebens. Schließlich besteht die RNase P in humanen Mitochondrien und pflanzlichen Organellen/Zellkernen ausschließlich aus Polypeptiden. Graue Linien stellen die RNA-Untereinheit dar. Protein-Untereinheiten sind als farbige Kreise und Ovale dargestellt.

1.2.1 Die bakterielle RNase P

Alle bis heute identifizierten bakteriellen RNase P-Enzyme bestehen aus einer RNA- und einer Protein-Untereinheit (Stark *et al.* 1978), (Altman 2011). Die RNA ist 350 – 450 Nt lang und hat eine Masse von etwa 125 kDa, während das Protein eine Masse von nur etwa 14 kDa besitzt. Die RNA ist *in vitro* unter Hochsalz-Bedingungen alleine katalytisch aktiv (Guerrier-Takada *et al.* 1983), *in vivo* ist hingegen auch die Protein-Untereinheit für die Prä-tRNA-Prozessierung und das Zellwachstum notwendig (Schedl and Primakoff 1973), (Waugh and Pace 1990), (Gößringer *et al.* 2006). Das P Protein ist zwischen verschiedenen Bakterien austauschbar (Guerrier-Takada *et al.* 1983), (Gößringer and Hartmann 2007), so wie auch die P RNA unter Bakterien austauschbar ist (Waugh and Pace 1990), (Wegscheid *et al.* 2006). Die bakteriellen RNase P Proteine weisen auch unter entfernt verwandten Bakterien hochkonservierte Strukturen auf. Die Analyse der Proteinstrukturen verschiedener Spezies (Spitzfaden *et al.* 2000), (Stams *et al.* 1998), (Kazantsev *et al.* 2003) ergab eine übereinstimmende Sekundärstruktur, in welcher die Anordnung von drei α -Helices und einem β -Faltblatt (Topologie: $\alpha \beta \beta \beta \alpha \beta \alpha$) zwei RNA-bindende Domänen ergibt: Eine zentrale Tasche („central cleft“, (Stams *et al.* 1998)) und das „RNR-Motif“. Obgleich die bakteriellen P Proteine strukturell und funktionell homolog sind, stimmen insgesamt nur etwa 10 % der Aminosäuresequenzen überein (Koutmou *et al.* 2011), (Jovanovic *et al.* 2002), wobei sich von den 10 % übereinstimmenden Aminosäuren etwa die Hälfte im sogenannten RNR-Motif befindet. Die ersten drei Aminosäuren dieses Motifs sind namensgebend. Für *Bacillus subtilis* ist die Aminosäuresequenz R60, N61, R62, K64, R65, R68. Die beiden Arginine an Position 60 und 65 (in *B. subtilis*) sind invariabel und das Arginin an Position 68 ist in über 80 % aller bakteriellen P Proteine konserviert (Jovanovic *et al.* 2002), (Koutmou *et al.* 2011).

1.2.2 Die archaeale RNase P

Die archaeale RNase P setzt sich aus einer RNA-Untereinheit und vier Hauptprotein-Untereinheiten (RPP21, RPP29, RPP30 und POP5) sowie einer assoziierten fünften Protein-Untereinheit (ribosomales Protein L7Ae) zusammen (Cho *et al.* 2010). Obwohl Pop5 in Bezug auf Sekundärstrukturelemente und deren Anordnung Ähnlichkeiten zu bakteriellen P Proteinen aufweist (Wilson *et al.* 2006), ist keines der archaealen P Proteine homolog zu der bakteriellen Protein-Untereinheit (Hall and Brown 2002). Die vier Hauptprotein-Untereinheiten assoziieren zu zwei Heterodimeren (RPP21/RPP29 und RPP30/POP5) (Kifusa *et al.* 2005), (Tsai *et al.* 2006). Die archaeale RNase P RNA ist der bakteriellen P RNA strukturell ähnlich (Brown and Haas 1995) und besitzt unter (extremen) Hochsalzbedingungen in Abwesenheit der Proteine eine signifikante katalytische Restaktivität (Pannucci *et al.* 1999).

Eine Ausnahme bezüglich der Zusammensetzung der archaealen RNase P und in Bezug auf die RNase P RNA allgemein bildet die kürzlich entdeckte Minimal-RNase P in der Spezies *Pyrobaculum* der *Crenarchaea* (Lai *et al.* 2010). Sie besteht aus nur drei Protein-Untereinheiten und einer reduzierten P RNA, die keine Spezifitäts-Domäne besitzt. Damit ist diese RNA-Untereinheit auch im Vergleich zu allen anderen P RNAs außergewöhnlich. Eine weitere Ausnahme - nicht nur innerhalb der Archaeen, sondern bezogen auf alle charakterisierten Spezies - stellt das *Nanoarchaeum equitans* dar, welches keine RNase P besitzt. In diesem parasitären Archaeon werden die tRNAs bereits als mature tRNAs mit einem 5'-Triphosphat-Ende transkribiert (Randau *et al.* 2008), so dass diese Zellen auch in Abwesenheit der ansonsten essenziellen RNase P-Aktivität überlebensfähig sind.

1.2.3 Die RNase P in Eukaryonten

1.2.3.1 Die nukleäre eukaryontische RNase P

Die nukleär lokalisierten eukaryontischen RNase P-Formen sind am besten in Hefe und im Menschen untersucht. Die P RNA ist der von Bakterien und Archaeen strukturell ähnlich (Frank *et al.* 2000). In Abwesenheit von Protein-Untereinheiten ist auch die eukaryontische nukleäre P RNA *in vitro* sehr schwach katalytisch aktiv (Kikovska *et al.* 2007). Die Anzahl der Protein-Untereinheiten beträgt neun in Hefe und zehn im humanen System (Jarrous and Gopalan 2010). Keines der eukaryontischen nukleären P Proteine ist zum bakteriellen P Protein homolog, aber es bestehen Homologien zu den vier archealen P Hauptproteinen (Hall and Brown 2002). Viele der Protein-Komponenten der mitochondrialen RNA-prozessierenden RNase (RNase MRP) sind identisch mit den eukaryontischen RNase P Protein-Untereinheiten. Die RNase MRP ist im Zellkern lokalisiert und prozessiert u.a. ribosomale RNAs, jedoch keine Prä-tRNAs (Esakova and Krasilnikov 2010), (Walker *et al.* 2010). In den Genomen der meisten Pflanzen konnte bioinformatisch keine nukleäre RNase P RNA entdeckt werden (Yusuf *et al.* 2010), obwohl RNase P-Aktivität nachgewiesen wurde (Schön, A. Ribonuclease P from plant nuclei and photosynthetic organelles. Mol. Biol. Rep. 22, 139–145 (1995). Ebenso wenig wurden Proteine identifiziert, die homolog zu Zellkern-lokalisierten eukaryontischen RNase P Enzymen sind.

1.2.3.2 Eukaryontische RNase P in Chloroplasten

Auch in eukaryontischen Plastiden wurde RNase P-Aktivität nachgewiesen (Wang *et al.* 1988). Eine RNase P RNA konnte jedoch nur in wenigen Plastiden identifiziert werden (Li *et al.* 2007), (Vioque 2010). Anfangs durchgeführte Studien mit Spinat-Chloroplasten deuteten

erstmalig auf eine RNase P-Aktivität hin, die keine RNA-Untereinheit besitzt (Wang *et al.* 1988). Kürzlich konnte dann gezeigt werden, dass in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* protein-basierte RNase P-Enzyme (*proteinaceous RNase P*, PRORP) vorhanden sind, welche dann mittels bioinformatischen Analysen ebenso in Chloroplasten der meisten Landpflanzen und Grünalgen gefunden wurden (Gobert *et al.* 2010), siehe auch 1.2.4.

1.2.3.3 Eukaryontische RNase P in Mitochondrien

1.2.3.3.1 Mitochondriale RNase P in Hefe

Die mitochondriale RNase P-Aktivität in Hefe basiert auf einer RNA- und mindestens einer Protein-Untereinheit. Die RNA-Untereinheit (Rpm1r) konnte identifiziert werden und ist im mitochondrialen Genom kodiert (Martin *et al.* 1985). Studien, in denen anhaltende RNase P-Aktivität bei gleichzeitig unterbundener Synthese von mitochondrialen Proteinen zu beobachten war, zeigten, dass die Proteinkomponente(n) nukleär kodiert sein müssen (Hollingsworth and Martin 1986). Das bislang identifizierte 105 kDa große Rpm2p-Protein ist zu keinem bekannten RNase P Protein aus Bakterien, Archaeen oder Eukaryonten homolog. Versuche zur Rekonstitution mitochondrialer RNase P-Aktivität aus den beiden Komponenten blieben bisher erfolglos.

1.2.3.3.2 Mitochondriale RNase P in Pflanzen

Obgleich RNase P-Aktivität *in vitro* in partiell aufgereinigtem Extrakt pflanzlicher Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Marchfelder *et al.* 1990), (Marchfelder and Brennicke 1994), ist es erst kürzlich gelungen, die pflanzliche mitochondriale RNase P zu identifizieren (Gobert *et al.* 2010). Voraussetzung hierfür war die Identifizierung der RNase P-aktiven Komponenten in humanen Mitochondrien (Holzmann *et al.* 2008). Daraufhin gelang es, orthologe Protein-basierte Enzyme zu identifizieren, die nicht nur die Prozessierung von Prä-tRNAs in pflanzlichen Mitochondrien, sondern auch in anderen pflanzlichen Zellkompartimenten übernehmen. Darüber hinaus wurden diese orthologen Enzyme auch in anderen Spezies gefunden (siehe auch 1.2.4).

1.2.3.3.3 RNase P in humanen Mitochondrien

2008 wurde das Enzym identifiziert, das die 5'-Prozessierung von Prä-tRNAs in humanen Mitochondrien ausführt (Holzmann *et al.* 2008). Die humane mitochondriale RNase P (humane mtRNase P) weicht in ihrer Zusammensetzung vom ubiquitären Aufbau der Ribonukleoprotein-basierten RNase P ab. Sie besitzt keine RNA-Untereinheit und ist ein rein Protein-basiertes Enzym, das sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt: 1) eine tRNA Methyltransferase (TRMT10C); 2) eine zur *short-chain dehydrogenase/reductase*- (SDR-) Super-Familie gehörende Untereinheit (SDR5C1) und 3) eine Metallonuklease, die mit N-terminalen *Pentatricopeptid repeat*- (PPR-) Motiven verbunden ist. Die dritte Untereinheit gehört zu einer neu definierten Familie putativer Nukleasen - genannt *proteinaceous RNase P* (PRORP, siehe auch 1.2.4) – und ist die katalytische Komponente der humanen mitochondrialen RNase P. Die beiden anderen Untereinheiten (TRMT10C und SDR5C1) werden jedoch zur Prä-tRNA-Prozessierung *in vivo* und *in vitro* benötigt (Holzmann *et al.* 2008), (Rossmann 2012).

1.2.4 Protein-basierte RNase P

Die Protein-basierte RNase P (*proteinaceous RNase P*, PRORP) wurde kurz nach der Entdeckung der humanen mtRNase P in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Gobert *et al.* 2010). Die PRORP-Enzyme in *A. thaliana* sind homologe Orthologe der Metallonuklease-Untereinheit der humanen mtRNase P und übernehmen als singuläre Protein-Enzyme ohne die Beteiligung weiterer Komponenten die RNase P-Aktivität in Mitochondrien, Chloroplasten und Nuklei. Insgesamt wurden drei Varianten des PRORP-Enzyms in *A. thaliana* identifiziert (PRORP1, PRORP2 und PRORP3), die eine unterschiedliche Lokalisation aufweisen (Gobert *et al.* 2010). PRORP2 und PRORP3 sind im Zellkern lokalisierte Homologe von PRORP1, welches in den Chloroplasten und Mitochondrien in *A. thaliana* detektiert wurde. PRORP1 ist *in vivo* essenziell. Eine Deletion der nukleären Enzyme PRORP2 bzw. PRORP3 ist nur lethal, wenn beide Enzyme gleichzeitig ausgeschaltet werden (Gutmann *et al.* 2012). Die Funktion der PRORP-Enzyme wurde ferner in heterologen Komplementationsstudien in Prokaryonten und Eukaryonten unter Beweis gestellt. So kann PRORP1 aus *A. thaliana* in *E. coli* die endogene RNase P *in vivo* komplementieren (Gobert *et al.* 2010). Weitere Orthologe von PRORP wurden in *Trypanosoma brucei* nachgewiesen (Taschner *et al.* 2012). Auch in *T. brucei* sind sowohl das im Zellkern lokalisierte PRORP1 als auch das mitochondrial lokalisierte PRORP2 singuläre RNase P-Enzyme. Mit PRORP1 aus *T. brucei* gelang die heterologe Komplementation der nukleären RNase P aus Hefe *in vivo* (Taschner *et al.* 2012). Anhand der genannten Komplementationsstudien konnte demonstriert werden, dass die singulären Protein-Enzyme die Funktion der RNA-abhängigen RNase P-Enzyme, selbst der großen nukleären Ribonukleoprotein-Komplexe in Eukaryonten, *in vivo* übernehmen können. Evolutiv gesehen ist die Alge *Ostreococcus tauri* interessant, da sie womöglich eine Zwischenstufe in der Entwicklung der RNase P darstellt. In diesem Organismus wurde eine RNA-basierte und Protein-basierte RNase P nachgewiesen. Im mitochondrialen Genom und im Plastid-Genom sind zwei verschiedene RNase P RNAs kodiert und im Zellkern sind sowohl ein bakterielles P Protein als auch ein PRORP-Enzym kodiert (Lai *et al.* 2011). PRORP-Enzyme besitzen eine N-terminale *Pentatricopeptid repeat*- (PPR-)Domäne, die über eine zentrale Zink-bindende Kerndomäne mit einer C-terminalen Metallonuklease-Domäne verbunden ist (Howard *et al.* 2012). Diese strukturellen Gemeinsamkeiten begründen die Identität der PRORP-Enzyme als neue Nuklease-Familie (Gobert *et al.* 2010). Die Kristallstruktur von *A. thaliana* PRORP1 zeigt, dass das Protein die Form eines „V“ aufweist (Howard *et al.* 2012). Ein Arm des Moleküls entspricht der PPR-Domäne, die über die zentrale Zink-bindende Domäne mit dem anderen Arm, der Metallonuklease-Domäne, verbunden ist. PPR-Motive liegen oftmals in Reihe hintereinander vor und setzen sich aus Helix-Kehre-Helix-Motiven zusammen (Small and Peeters 2000). Die PPR-Domäne von PRORP1 besteht aus 11 α -Helices, die 5,5 hintereinander liegende PPR-Strukturen bilden. Diese aufeinanderfolgenden helikalen Motive assoziieren zu einer rechtsgängigen superhelikalen Struktur. Die PPR-Domäne bildet eine konkave Oberfläche, welche dem vermutlich aktiven Zentrum, der Metallonuklease-Domäne, zugewandt ist. In der konservierten Zink-bindenden Struktur der Kerndomäne werden Zinkionen von vier invariablen Aminosäuren koordiniert. Dieser Struktur werden von Howard *et al.* zwei Funktionen zugeschrieben: eine Stabilisierung der Kern-Domäne sowie die Unterstützung der Kerndomänen-Orientierung hin zur Metallonuklease-Domäne (Howard *et al.* 2012). Die Metallonuklease-Domäne von PRORP wird anhand ihrer Sequenz- und Struktureigenschaften in die NYN-Familie (*Nedd4-BP1*, *YacP nucleases*) eingeordnet

(Anantharaman and Aravind 2006). Strukturelle Ähnlichkeiten bestehen weiterhin zur PIN (*PilT N-terminal*)-Nuklease-Familie und FLAP/5'→3'-Exonuklease-Superfamilie. In dem vermuteten aktiven Zentrum der PRORP-Enzyme sind vier invariable Aspartat-Seitenketten für die Katalyse essenziell und an der Bindung von Metallionen beteiligt (Gobert *et al.* 2010), (Gobert *et al.* 2013).

1.3 Enzym-Substrat-Wechselwirkungen

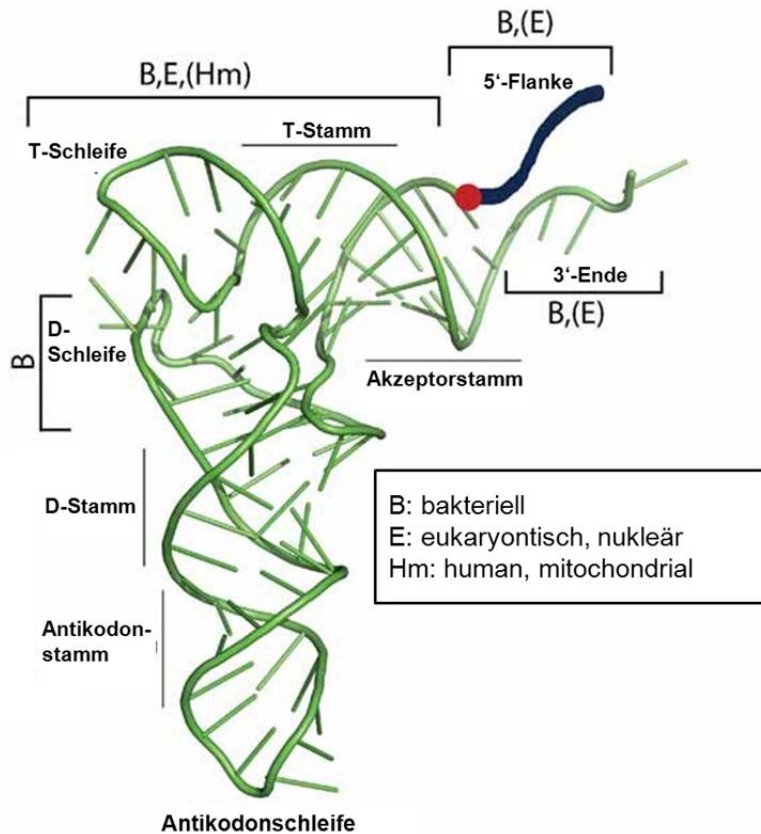


Abbildung 1.2: Strukturelle Regionen zur Substraterkennung durch die RNase P, modifiziert nach Marvin und Engelke 2009. Darstellung von Strukturmotiven einer tRNA, die der Substraterkennung durch RNase P-Enzyme aus Bakterien, eukaryontischen Nuklei und humanen Mitochondrien dienen.

Die Substraterkennung durch das bakterielle RNase P Holoenzym erfolgt hauptsächlich über vier Interaktionen mit dem Substrat. Zum einen interagieren freie Basen in den konservierten Regionen CR II und III der Spezifitäts-Domäne der P RNA mit Nukleotiden der TΨC-Schleife und der D-Schleife der tRNA (LaGrandeur *et al.* 1994), (Loria *et al.* 1998), (Loria and Pan 1997), (Odell *et al.* 1998), (Pan *et al.* 1995). Einzelne Nukleotide dieser beiden Schleifen sind in allen tRNAs hochkonserviert (Marck and Grosjean 2002). In die zweite Enzym-Substrat-Interaktion ist ein ungepaartes Adenosin der konservierten Helix P11 in der Spezifitäts-Domäne der P RNA involviert. Das Adenosin bildet mit dem Akzeptorstamm der tRNA ein *A-minor*-Motiv. Drittens basenpaaren Nukleotide des 3'-CCA-Endes der tRNA mit Nukleotiden in der L15-Schleife der katalytischen Domäne der RNase P RNA (Wegscheid and Hartmann 2006), (Kirsebom and Svard 1994), (Svard *et al.* 1996), (Busch *et al.* 2000), (Wegscheid and Hartmann 2007). Die vierte Interaktion findet zwischen dem P Protein und der 5'-Flanke der Prä-tRNA statt (Koutmou *et al.* 2010), (Niranjanakumari *et al.* 1998b). Diese Wechselwirkung begünstigt vermutlich die Substratbindung relativ zur Produktbindung (Tallsjo and Kirsebom 1993). Die Substraterkennung durch PRORP ist bisher nicht so detailliert untersucht wie bei

Einleitung

der bakteriellen RNase P. *Pentatricopeptide repeat* (PPR)-Proteine sind RNA-bindende Proteine, die eine Funktion im RNA-Metabolismus von Organellen besitzen. Die RNA-Interaktion erfolgt vermutlich über die in Tandem angeordneten PPR-Motive (Mili and Pinol-Roma 2003), (Meierhoff *et al.* 2003). Howard *et al.* (2012) postulieren, dass die PPR-Domäne von PRORP an der Bindung der Prä-tRNA beteiligt ist und dazu beiträgt, dass die 5'-Flanke des tRNA-Substrats in das aktive Zentrum von PRORP orientiert wird. An der Basis nahe dem aktiven Zentrum hat die PPR-Domäne ein positiv gelades elektrostatisches Oberflächenpotential. Hier könnte es zu einer Interaktion mit dem negativ geladenen Phosphodiester-Rückgrat bzw. mit konservierten Basen einer gebundenen Prä-tRNA kommen (Howard *et al.* 2012). Ein weiteres positives Ladungsareal ist nahe der Zink-Bindestelle gelegen. Durch Bindung eines Zink-Atoms könnte die Struktur der zentralen Domäne dahingehend stabilisiert werden, dass die positiven Ladungen für eine Interaktion mit der Prä-tRNA entsprechend ausgerichtet werden (Howard *et al.* 2012). Eine vergleichbare strukturelle Funktion besitzen Zink-Bindestellen in Zink-Finger-Proteinen (Krishna *et al.* 2003). Weitere Analysen zur Substratbindung von PRORP1 aus *A. thaliana* (Gobert *et al.* 2013) ergaben, dass konservierte Nukleotide in der T- und D-Schleife der tRNA für die Prozessierung essenziell sind. Der Antikodon-Arm hingegen kann ohne signifikanten Effekt auf die Substratbindung deletiert werden. In der gleichen Studie wurde anhand von ermittelten SAXS (*small-angle X-ray scattering*)-Daten von PRORP2 und der vorhandenen tRNA^{Phe}-Kristallstruktur ein Enzym-Substrat-Modell entwickelt, in welches die bei der Studie gewonnenen Daten integriert wurden. Als Fixpunkte wurden die konservierten Nukleotide in der T-/D-Schleife der tRNA verwendet, die mit der PPR-Domäne interagieren. Ein weiterer Fixpunkt war das mature 5'-Ende der tRNA, welches in unmittelbare Nähe zu den konservierten Aspartat-Seitenketten im katalytischen Zentrum von PRORP2 positioniert wurde. Demnach umschließen die PPR-Domäne und die katalytische NYN-Domäne das tRNA-Substrat und funktionieren dadurch - zur exakten Bestimmung der Spaltstelle - wie eine Art molekulares Lineal. Ferner ist der Modus der Substratbindung in diesem Modell auffallend ähnlich zu dem der bakteriellen RNase P.

1.4 Der Katalyse-Mechanismus der Prä-tRNA-Prozessierung

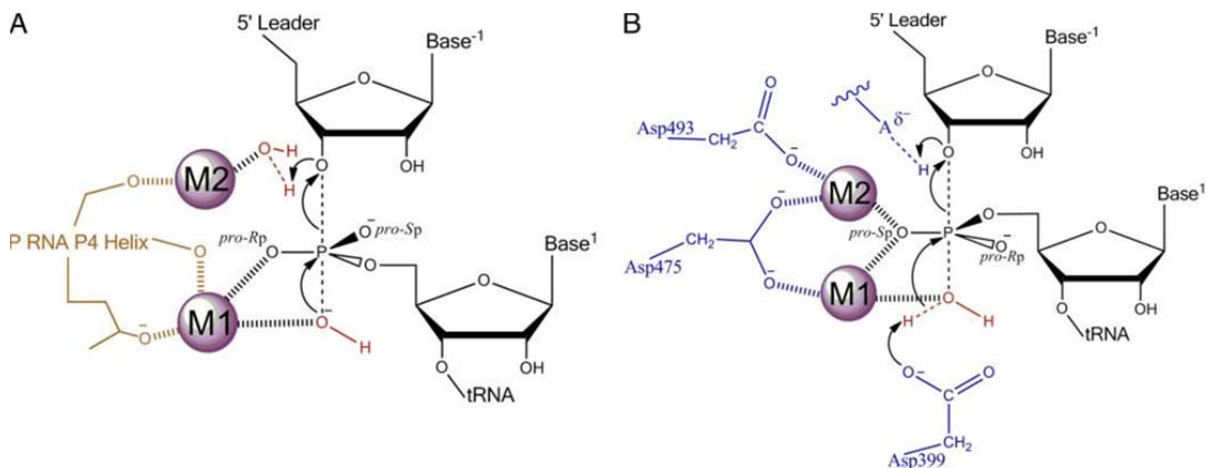


Abbildung 1.3: Vergleich der Katalyse-Mechanismen der Prä-tRNA-Prozessierung durch RNA-basierte RNase P und durch Protein-basierte RNase P.

A: Mechanismus, der für die RNA-basierte Prä-tRNA-Prozessierung postuliert wird.

B: Mechanismus, der für die Protein-basierte Prä-tRNA-Prozessierung postuliert wird.

Grafik: nach Howard *et al.* 2012.

Die Kristallstruktur der Protein-basierten RNase P ermöglicht neben einem Strukturvergleich mit der RNA-basierten RNase P auch einen Vergleich des Katalyse-Mechanismus der Prä-tRNA-Prozessierungsreaktion. Sowohl die RNA-basierte als auch die Protein-basierte RNase P spalten durch den nukleophilen Angriff eines Hydroxidions die Phosphodiesterbindung an der spezifischen Spaltstelle. Durch diese Hydrolyse wird die 5'-flankierende Sequenz der Prä-tRNA abgespalten. Die abgespaltene 5'-Flanke hat ein 3'-OH-Ende und die mature tRNA geht mit einem 5'-Phosphatende aus der Reaktion hervor.

Die Strukturanalysen haben gezeigt, dass beide RNase P-Enzyme Metalloenzyme sind. Vermutlich sind bei PRORP zwei Metallionen am Spaltmechanismus beteiligt. Dies lässt sich zum einen aus der strukturellen Ähnlichkeit zu den FLAP-Nukleasen ableiten, die ebenfalls einen Zwei-Metallionen-Mechanismus aufweisen. Zum anderen beruht die Annahme auch auf PRORP1-Kristallisationsdaten, die in Gegenwart verschiedener divalenter Metallionen ermittelt wurden (Orans *et al.* 2011), (Steitz and Steitz 1993), (Howard *et al.* 2012). Auch für die RNA-basierte RNase P wird postuliert, dass mindestens zwei divalente Kationen an der Spaltungsreaktion beteiligt sind (Smith and Pace 1993), (Warnecke *et al.* 1996).

Hinsichtlich der Metallionen-Koordination und der Generierung von nukleophilen Hydroxidionen bestehen aber Unterschiede zwischen der RNA-basierten und der Protein-basierten Reaktion. Auch die Stabilisierung der Abgangsgruppe erfolgt unterschiedlich (siehe Abbildung 1.3). Die Struktur von PRORP1 lässt vermuten, dass neben nicht-bindenden Sauerstoffatomen des Phosphodiesterückgrats zwei von vier konservierten Aspartatseitenketten an der Koordination der Metallionen beteiligt sind (Asp475, Asp493). Eine weitere dieser konservierten Aspartatseitenketten (Asp399) begünstigt wahrscheinlich die Deprotonierung eines Wassermoleküls, so dass ein nukleophiles Hydroxidion entsteht. Die Protonierung der Abgangsgruppe erfolgt möglicherweise über eine Histidinseitenkette an Position 498 (Howard *et al.* 2012). Beim RNA-basierten RNase P-Enzym hingegen werden die Metallionen von nicht-bindenden Sauerstoffatomen des Phosphodiesterückgrats sowie Sauerstoffatomen der Nukleotidbasen der katalytischen RNase P RNA koordiniert. Dabei generiert das Metallion M1 (siehe Abbildung 1.3) mutmaßlich das nukleophile Hydroxidion

Einleitung

der Katalyse und koordiniert zugleich den *pro-R_p*-Sauerstoff der zu spaltenden Phosphodiesterbindung. Das Metallion M2 könnte ein Wassermolekül derart positionieren, dass die Abgangsgruppe durch einen Protonentransfer vom Wassermolekül zum 3'-Oxyanion stabilisiert wird. Neuere Studien haben gezeigt, dass eine *R_p*-Phosphorothioat-Modifikation an der Spaltstelle keinen Einfluss auf die PRORP1-katalysierte Hydrolyse hat (Pavlova *et al.* 2012). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass der *pro-R_p*-Sauerstoff der zu spaltenden Phosphatbindung kein katalytisch essenzielles Metallion koordiniert. Dies steht im Gegensatz zur bakteriellen RNase P. Hier wird die Ratenkonstante der Spaltreaktion erheblich gesenkt, wenn das *pro-R_p*-Sauerstoffatom der zu spaltenden Phosphodiesterbindung durch Schwefel substituiert wird (Warnecke *et al.* 1996), (Warnecke *et al.* 1999), (Chen *et al.* 1997).

1.5 *Aquifex aeolicus*

Aquifex aeolicus ist ein gram-negatives mikroaerobes Bakterium, das bei Temperaturen zwischen 67°C und 95°C wächst. Das Genom des hyperthermophilen Bakteriums ist auf einem ringförmigen Chromosom (1,55 MBp) und einem Plasmid (13 kBp) kodiert (Deckert *et al.* 1998). Der NCBI Taxonomie zufolge gehört die Gattung *Aquifex* zur Familie der *Aquificaceae*. Neben den *Aquificaceae* werden auch die *Desulfurobacteriaceae* und die *Hydrogenothermaceae* der Ordnung *Aquificales* zugeordnet, die zur Klasse der *Aquificae* gehört. Eine eindeutige phylogenetische Einordnung von *Aquifex aeolicus* ist jedoch bis heute aufgrund widersprüchlicher Indizien nicht möglich (siehe Abbildung 1.4).

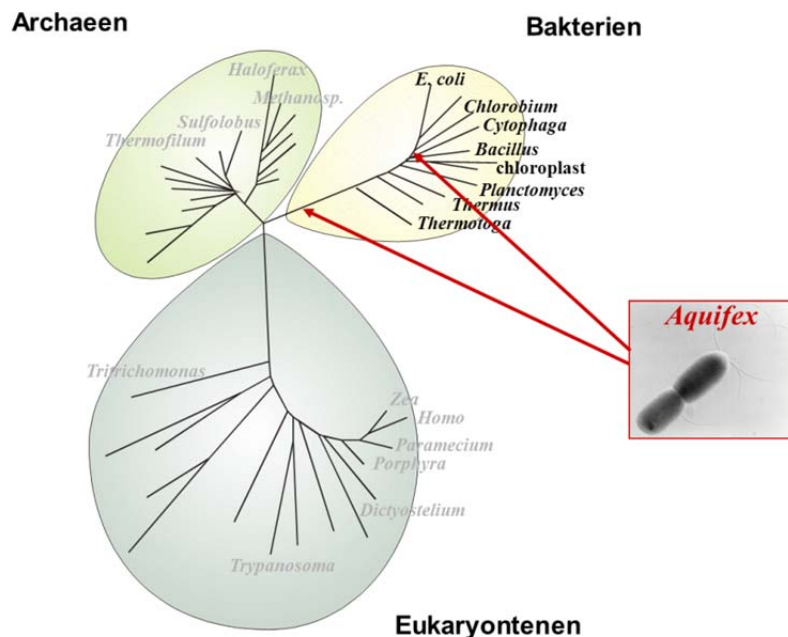


Abbildung 1.4: Phylogenetische Einordnung von *A. aeolicus*. Aufgrund widersprüchlicher Indizien kann *A. aeolicus* nicht eindeutig in den phylogenetischen Stammbaum eingeordnet werden.

Auf 16S rRNA und den Elongationsfaktoren Tu/G basierende phylogenetische Untersuchungen ordnen die Gattung *Aquifex* an der ursprünglichsten Stelle des bakteriellen Stammbaums ein (Huber *et al.* 1992), (Burggraf *et al.* 1992), (Bocchetta *et al.* 2000). Analysen der RNA Polymerase-Untereinheiten β , β' und σ^{70} sowie Untersuchungen zu konservierten kleinen Insertionen und Deletionen in einer Vielzahl von Proteinen legen hingegen eine engere Verwandtschaft von *Aquifex* mit den δ - und ϵ -Proteobacteria und der

Einleitung

Gruppe der Chlamydia–Cytophaga nahe (Klenk *et al.* 1999), (Gruber and Bryant 1998), (Gupta 2000), (Griffiths and Gupta 2004).

Eveleigh *et al.* zufolge sind die Ergebnisse phylogenetischer Untersuchungen von der Funktion der Gene abhängig, die in die Analysen einbezogen werden (Eveleigh *et al.* 2013). Eine Klassifizierung von *Aquifex* an der Basis des phylogenetischen Baums der Bakterien und eine enge Verwandtschaft zu den *Thermotogae* resultiert meist aus Vergleichen von Proteinen, die an der Translation beteiligt sind. Analysen von Genen, die in den Metabolismus oder in andere zelluläre Prozesse involviert sind, ergeben hingegen eine engere Beziehung zu den ϵ -Proteobakterien. Weitere bioinformatische Analysen legten nahe, dass *Aquifex aeolicus* mindestens 10 % seiner Protein-kodierenden Gene durch horizontalen Gentransfer von Archaeen übernommen hat (Aravind *et al.* 1998). Mit Ausnahme der *Aquificaceae* konnte die Ribonuklease P bisher in allen Bakterien identifiziert werden. Obgleich das Genom von *Aquifex aeolicus* sequenziert ist (Deckert *et al.* 1998) und eine Transkriptomanalyse durchgeführt wurde ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4), konnte die RNase P bis heute weder mittels experimenteller Ansätze (Marszalkowski *et al.* 2008), (Willkomm *et al.* 2005) noch bioinformatisch in *A. aeolicus* identifiziert werden (Hartmann and Hartmann 2003), (Li and Altman 2004a).

2 Zielsetzung

Die Ribonuklease P (RNase P) ist ein essenzielles Enzym, das in allen drei Domänen des Lebens (Bacteria, Archaea und Eukarya) vorkommt und für die 5'-Prozessierung von Vorläufer-tRNAs essenziell ist. Die endonukleolytische Abspaltung der 5'-flankierenden Sequenz ist Voraussetzung für die Teilnahme der tRNAs an der Proteinbiosynthese. Eine RNase P ist - mit Ausnahme der *Aquificaceae* - in allen charakterisierten Bakterien identifiziert worden. Die bakteriellen RNase P-Enzyme setzen sich aus einer katalytischen RNA- und einer kleinen Protein-Untereinheit zusammen (Altman 2011). *Aquifex aeolicus* gehört zur Familie der *Aquificaceae*, und obgleich das Genom von *A. aeolicus* sequenziert ist (Deckert *et al.* 1998), konnte weder das für die RNA-Untereinheit kodierende *rnpB*-Gen, noch das für die Protein-Untereinheit kodierende *rnpA*-Gen identifiziert werden (Swanson 2001). Trotz der offensichtlichen Abwesenheit der bakteriellen RNase P-Gene konnte RNase P-Aktivität in Zellextrakt von *A. aeolicus* nachgewiesen werden (Marszalkowski *et al.* 2008), (Lombo and Kaberdin 2008). Die Analysen gaben allerdings keinen Aufschluss über die Identität und biochemische Zusammensetzung des gesuchten Enzyms. So gelang es nicht, Protokolle für eine RNA-Extraktion bzw. Proteinpräparation zu erstellen, um RNase P-Aktivität aus Zelllysatz zu regenerieren. Die Frage, ob eine RNA-Komponente zur Aktivität der *A. aeolicus* RNase P beiträgt, blieb letztlich unbeantwortet. Weitere intensivste bioinformatische Analysen blieben trotz neuer strategischer Ansätze ergebnislos (Li and Altman 2004a), (Hartmann and Hartmann 2003), ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4). Auch ein experimenteller RNomics-Ansatz (Willkomm *et al.* 2005) sowie eine ausführliche Transkriptomanalyse von *A. aeolicus* brachten keine konkreten Hinweise auf die Identität des Enzyms (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck).

Bei diesem Wissensstand zur RNase P von *A. aeolicus* wurde die vorliegende Studie begonnen. Das Ziel der Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung der RNase P in *A. aeolicus* mittels eines biochemischen Ansatzes. In Anbetracht der bislang bekannten Formen der RNase P musste bei der Etablierung der Methode berücksichtigt werden, dass es sich bei der RNase P entweder um ein Ribonukleoprotein unbekannter Komplexität oder ein Proteinenzym handelt. Demnach mussten Aufreinigungsbedingungen entwickelt werden, unter denen einerseits die vermeintlichen Untereinheiten eines Ribonukleoprotein-Komplexes nicht voneinander getrennt werden, die andererseits aber eine ausreichende Trennleistung gewährleisten, damit möglichst reine RNase P-aktive Fraktionen erhalten werden. Effizienz und gute Reproduzierbarkeit waren weitere Anforderungen an die Methode. Dies war aufgrund der von anderen bakteriellen Zellsystemen her bekannten sehr geringen Expression der RNase P-Komponenten erforderlich (Dong *et al.* 1996), (Reich *et al.* 1986), (Barrera and Pan 2004). Folglich war davon auszugehen, dass zur Gewinnung ausreichender Mengen an reiner RNase P-Fraktion für anschließende Analysen (z.B. Massenspektrometrie oder RNA-Seq), die mehrstufige Aufreinigung mehrmals wiederholt werden musste.

Aus der Fragestellung bezüglich der Identität der RNase P in *A. aeolicus* hat sich ein Nebenprojekt entwickelt. Die Aufgabe in diesem Projekt bestand darin, die Transkripte bereits bekannter als auch neuer, bioinformatisch vorhergesagter nicht-kodierender RNAs (ncRNAs) in *A. aeolicus* mittels Northern Blots nachzuweisen. Auswertungen von Transkriptomdaten zeigten, dass zu vielen ncRNAs in *A. aeolicus* auch *antisense* RNAs

Zielsetzung

transkribiert werden. Die Transkriptionsstärke der *antisense* RNAs ist dabei im Vergleich zu anderen Organismen ungewöhnlich hoch. Die Produktion dieser *antisense* RNAs sollte ebenfalls mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 *Aquifex aeolicus* Zellen

Aquifex aeolicus Zellen wurden als Zellpellets kommerziell von M. Thomm and R. Huber, Universität Regensburg, erworben. Die Zellen wurden nach einem Tag Wachstum in der spät-exponentiellen Phase wie beschrieben geerntet (Huber *et al.* 1992).

3.1.2 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1</i> <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Sambrook 1989)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ (DE3) pLysS(cm ^R)	(William Studier <i>et al.</i> 1990) (Studier 1991)

3.1.3 Verwendete Plasmidvektoren

3.1.3.1 Plasmide als Templat für *in vitro* Transkriptionen

Vektor	relevanter Genotyp	linearisiert mit	Referenz
pDW66	<i>B. subtilis</i> P RNA	<i>Dra</i> I	(Smith <i>et al.</i> 1992)
pSBpt3'hh	pSP64 Vektor mit <i>T. thermophilus</i> Prä-tRNA ^{Gly} mit 14-nt-Flanke gekoppelt an eine T7 RNA Promotersequenz	<i>Bam</i> HI	(Busch <i>et al.</i> 2000)
pJA2'	<i>E. coli</i> P RNA	<i>Fok</i> I	(Vioque <i>et al.</i> 1988)
pEc595/ <i>Bbs</i> I	pUC19 Vektor mit <i>E. coli</i> Prä-tRNA ^{His} gekoppelt an eine T7 RNA Promotersequenz	<i>Bbs</i> I	(Sun <i>et al.</i> 2006)
pBB1	pUC18-T7- <i>bsrA</i> -190 <i>B.subt.</i> 6S-1 RNA (190)	<i>Hind</i> III	(Beckmann 2010)

3.1.3.2 Plasmide für die Herstellung von Proteinen

Vektor	relevanter Genotyp	Referenz
pPWT1	<i>B. subtilis</i> P Protein	(Niranjanakumari <i>et al.</i> 1998a)
pET-28b(+)	<i>A. thaliana</i> PRORP1	(Pavlova <i>et al.</i> 2012)

3.1.4 Primer

3.1.4.1 Primer zur Herstellung nicht-kodierender RNAs aus *A. aeolicus*

siehe Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (Angabe 5' → 3')
as-tmRNA / revers- komplementäre sense-tmRNA	P_30_A.ae_as-tm_3'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CCG AGG CTC TAC AGG CTT AGC CCG -3'
	P_31_A.ae_as-tm-5'T7	5'- AAA CGG CAG CGC GTC CCC -3'
sense-tmRNA / revers- komplementäre as-tmRNA	>P_26_A.ae.tmRNA-3'	5'-TGG TGG AGG CGG CGG GAA TCG AAC CC -3'
	>P_27_A.ae.tmRNA-5'- T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GCG GAA AGG ATT CGA CGG GG -3'
*Sonde gegen as-tmRNA:	P_75_as-tmRNA- 2.Sonde-5'	5'- GGC AAG CTC CCC GAG GGT AG -3'
	P76_astmRNA-2.Snd- 3'T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CAC GGG GCT GAG TAG CTG A -3'
*Sonde gegen sense-tmRNA	P77_sense- tm_2.Snd_5'	5'- GCG TCC CCG GTA GGT TTG CG -3'
	P78_sense- tm2Snd3'T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTG TCT CTG ACG CCC TCC G -3'
as-aq_t05 revers- komplementär	>P_69_aq_t05_3'	5'- TGG AGC GGG CGA CGG GAC -3'
	>P_70_aq_t05_5'T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGG GCG TAG CTC AGA GGT AGA GCA C -3'
N25+ / N25- revers- komplementär	>P_38_n25+_Ctrl_3'	5'- GAA AAA ATT TCT CAA AAG GAG GTG AAA GGC -3'
	>P_39_n25+_Ctrl_5'T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAA TTT TCT TAG CGA TTT CCT TGA CGT CC -3'
N25+ revers- komplementär / N25-	>P328943-3':=18	5'-TTA GCG ATT TCC TTG ACG TC-3'
	>P328943-5'-T7:=19	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAT TTA ATT GAA AAA ATT TCT CAA AAG GAG G-3'
*Sonde gegen N25+	>P_37_n25+_Snd_5'	5'- TAA TTT TCT TAG CGA TTT CCT TGA CGT CC -3'
	>P_40_n25+_Snd_3'T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG AAA AAA TTT CTC AAA AGG AGG TGA AAG GC -3'
*Sonde gegen N25-	>P328943-5':=17	5'-TAT TTA ATT GAA AAA ATT TCT CAA AAG GAG G-3'
	>P328943-3'-T7:=20	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TTA GCG ATT TCC TTG ACG TC-3'
N 75+ / N75- revers- komplementär	>P_58_n75+_Ctrl_3'	5'- GAA AGC CCC TCC CTC CCC CCA -3'
	>P_59_n75+_Ctrl_5'T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG AAA GGG CCT CCC GGG CGG -3'
N75+ revers-	>P1168992-3':=6	5'-TAG AAA GGG CCT CCC GGG -3'

Material

komplementär / N75-	>P1168992-5'-T7:=7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGA GAG GTG AGA AAG CCC CTC -3'
*Sonde gegen N75+	>P_57_n75+_Snd_5'	5'- AAA GGG CCT CCC GGG CGG -3'
	>P_60_n75+_Snd_3'T7	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG AAA GCC CCT CCC TCC CCC CA -3'
*Sonde gegen N75-	>P1168992-5':=5	5'-AGA GAG GTG AGA AAG CCC CTC -3'
	>P1168992-3'-T7:=8	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG TAG AAA GGG CCT CCC GGG -3'

T7 Promoter-Sequenzen (5'-TAATACGACTCACTATA-3') kursiv

*Die *in vitro* transkribierten Sonden wurden mittels DIG RNA Labeling Mix intern Digoxigenin-markiert.

„as-“: *antisense*

3.1.4.2 Primer für eine putative RNase P RNA aus *A. aeolicus*

Bezeichnung	Sequenz (Angabe 5' → 3')
P_79 Aae_put-PRNA5'	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GTC TGA GTG TTT ACT TGG CGA GAA GG -3'
P_80_Aae_put-PRNA3'	5'- TCT GAG TTT TGG TAC TCC GCT TTC C -3'

T7 Promoter-Sequenzen (5'-TAATACGACTCACTATA-3') kursiv

3.1.5 Synthetische Oligonukleotide

(Integrated DNA Technologies, Belgien)

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (Angabe 5' → 3')
Positiv-Kontrolle as-tRNA 44	Ctrl_antisense_aq_t05	5'- CUC CUG CUU GGG AAG CAG GU-3'

3.1.6 LNA-Sonden

(Exiqon, Dänemark)

Verwendung	Bezeichnung	Sequenz (Angabe 5' → 3')
Sonde gegen die putative RNase P RNA aus <i>A. aeolicus</i>	put_RNaseP_RNA_A	5'Dig- A gTC TGA GTC ACC GgA -3'
Sonde gegen as-tRNA 44	T1	5'-Dig- ACC tGC TTC CCA AGC aGG AG -3'

kleine Buchstaben kennzeichnen LNA-Modifikationen

Dig kennzeichnet Digoxigenin-Modifikationen

3.1.7 Enzyme

Alkalischer Phosphatase "Fast AP"	Thermo Scientific
FastDigest Hind III	Thermo Scientific
<i>Dra</i> I	Thermo Scientific
<i>Bam</i> HI	Thermo Scientific
<i>Fok</i> I	Thermo Scientific
<i>Bbs</i> I	Thermo Scientific
T4 PNK	Thermo Scientific
Micrococcal Nuclease	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNA polymerase	Thermo Scientific
	und laborinterne Präparation
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific
T7 RNA Polymerase	Thermo Scientific
	und laborinterne Präparation
RQ1 RNase-free DNase	Promega
DNase I (Turbo DNase)	Ambion

3.1.8 Antikörper

Anti-Digoxigenin-AP Fab	Roche
-------------------------	-------

3.1.9 Größenmarker

3.1.9.1 Größenmarker für DNA

50 bp DNA-ladder	Roth
2 LOG DNA-ladder	New England Biolabs

3.1.9.2 Größenmarker für RNA

RiboRuler™ Low Range	Thermo Scientific
----------------------	-------------------

3.1.9.3 Größenmarker für Proteine

PageRuler™ Plus Prestained	
Protein Ladder	Thermo Scientific

3.1.9.4 Kalibrierproteine für die Gelchromatographie-Säule

Apo ferritin Horse spleen 25 mg/ml	Sigma-Aldrich
Kit for Molecular weights 12 – 200 kDa	Sigma-Aldrich

3.1.10 Kits

DIG Easy Hyb Northern Starter Kit	Roche
DIG RNA Labeling Mix	Roche
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche
Long PCR Enzyme Mix	Thermo Scientific
T7 High Yield Transcription Aid Kit	Thermo Scientific
Kit for Molecular weights 12 – 200 kDa	Sigma-Aldrich
Nucleobond® AX 500 Columns	Macherey-Nagel
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen

Material

3.1.11 Chemikalien

$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Hartmann Analytic GmbH
1,2-Bis-(2-aminoethoxy)- ethan- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- Carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich
1-Methylimidazol (99 %)	Acros Organics
Aceton p.a.	Roth
Acrylamid M-Bis (50 % Stammlösung, 48 : 2)	Gerbu
Agar Agar	Serva
Agarose	Roth
Aluminiumsulfat 16-Hydrat	Fluka
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Ammoniumsulfat	Gerbu
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Arabinose	Roth
β -Mercaptoethanol	Serva
Bio-RAD Protein Assay	Bio-RAD
Borsäure	Roth
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
CDP-Star	Roche
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroform	Merck
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Biosciences
Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250	Serva
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Boehringer
DIG Easy Hyb Granules	Roche
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dithiothreitol	Gerbu
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Erythromycin	Merck
Essigsäure 100 % p.a.	Roth
Ethanol p.a. 99.8 %	Roth
Ethidiumbromid-Lösung	Roth
Ethylenglykoltetraessigsäure	Roth
Formaldehyd 37 %	Riedel-de Haën
Formamid	Sigma-Aldrich
Glukose	Merck
Glycerin	Gerbu
Glycogen	Roche Applied Biosciences
Harnstoff	Gerbu
HEPES	Gerbu

Material

Hefeextrakt	Gerbu
Imidazol	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Roth
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumthiosulfat	Roth
Ni-NTA Agarose (Superflow)	Qiagen
N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamin (TEMED)	Roth
Nukleosidtriphosphate (NTPs)	Roche Applied Biosciences
ortho-Phosphorsäure 85 % p.a.	Roth
Pepton	Roth
Phenol	Roth
Polyethylenglycol 40000	Serva
Pyrophosphatase	Roche Applied Biosciences
Roti®-Aqua-Phenol zur RNA-Extraktion	Roth
Rotiphorese 30 (Acrylamid-/Bisacrylamid-Lsg.)	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure 32 % p.a.	Riedel-de Haën
Sephadex G 100	Sigma-Aldrich
Silbernitrat	Roth
Spermidin	Roth
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris X)	Gerbu
Triton X-100	Serva
Tween 20	Sigma-Aldrich
Xylencyanolblau	Serva

Alle weiteren Chemikalien, welche oben nicht aufgeführt sind, wurden von Sigma-Aldrich, Roth, Gerbu, Roche oder Thermo Scientific erworben und hatten den Reinheitsgrad "pro analysis" und/oder „RNase-frei“.

3.1.12 Puffer und Lösungen

3.1.12.1 Allgemeines zur Herstellung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer und Lösungen mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt. Doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) wurde durch doppelte Destillation von demineralisiertem Wasser hergestellt, welches anschließend autoklaviert wurde (20 min, 121 °C, 1 bar).

Alle Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert.

Die pH-Einstellung der Puffer erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

Bei den DTT-enthaltenden Puffern wurde das DTT kurz vor Verwendung des jeweiligen Puffers hinzugefügt. Eine Ausnahme wurde bei der Herstellung von Stammlösungen für Puffer gemacht, welche anschließend zu 1 ml-Aliquots aliquotiert wurden. Die DTT-haltigen 1ml-Aliquots wurden für den Enzym-Mix und für den Substrat-Mix im Enzymtest auf RNase P (3.2.6.2) verwendet. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und während der Verwendung immer auf Eis gelagert.

3.1.12.2 Verzeichnis verwendeter Puffer und Lösungen

<u>Puffer / Lösung</u>	<u>Kapitel</u>
ddH ₂ O (demineralisiertes Wasser zweifach destilliert)	3.1.12.1
DEAE-Elutionspuffer	3.2.7.2.1
Detektions-Puffer	3.2.4.7
Dialyse-Puffer für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-tag</i>	3.2.5.7.2
5x DNA-Probenpuffer	3.2.2.3.1
Elutionspuffer für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-Tag</i>	3.2.5.7.2
Entfärber für kolloidale Coomassie-Färbung	3.2.5.2.1
Entwicklerlösung für Silberfärbung	3.2.5.2.2
Extraktionspuffer	3.2.4.1
Fixierlösung für Silberfärbung	3.2.5.2.2
HIC-Startpuffer	3.2.7.2.2
KN-Puffer	3.2.6.1
	3.2.6.2
	3.2.6.5.2
Kolloidale Coomassie Färbelösung	3.2.5.2.1
Lagerpuffer für Silberfärbung	3.2.5.2.2
5x Laufpuffer für Proteingele	3.2.5.1
LB-Medium	3.2.1
Lysozym-Lösung zur Aufreinigung genomischer DNA	3.2.3.3
Lysozym-Stammlösung für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-tag</i>	3.2.5.7.2
PMSF-Stammlösung für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-tag</i>	3.2.5.7.2
4x Protein-Probenpuffer	3.2.5.1
Puffer A0	3.2.6.2
	3.2.6.5.2
5x Puffer A10	3.2.6.5
Puffer A10	3.2.7.1
	3.2.7.2.1

Material

Puffer A10	3.2.7.2.2
	3.2.7.2.3
Puffer A260	3.2.7.2.3
Rec-4 Puffer	3.2.7.3
Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer	3.2.7.3
2x RNA-Probenpuffer	3.2.2.3.2
	3.2.6.2
4x Sammelgel-Puffer	3.2.5.1
Silbernitratlösung für Silberfärbung	3.2.5.2.2
SOC Medium	3.2.1.4
Sonifizierungs-Puffer für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-Tag</i>	3.2.5.7.2
20x SSC-Puffer	3.2.4.7
Stopp-Lösung für Silberfärbung	3.2.5.2.2
Stringenz 1-Puffer	3.2.4.7
Stringenz 2-Puffer	3.2.4.7
TBE-Puffer	3.2.2.3.1
	3.2.2.3.2
TE-Puffer	3.2.3.3.1
4x Trenngel-Puffer	3.2.5.1
Vorfärbelösung für Silberfärbung	3.2.5.2.2
Wasch-Puffer für die <i>B. subtilis</i> P Protein Aufreinigung über <i>His-Tag</i>	3.2.5.7.2

3.1.13 Geräte und Verbrauchsmaterial

Agarosegel-Kammer	PerfectBlue Gel System Mini S/M, PEQLAB Biotechnology GMBH
ÄKTA™ <i>basic 10</i>	Amersham Biosciences
Autoklav	V 95, Systec
Blotter	C.B.S., Scientific Company Inc.

Chromatographie-Säulen

XK 16/20 Säule	Amersham Biosciences
DEAE Sepharose™ Fast Flow	GE Healthcare
HiTrap™ HIC Selection Kit	1 ml Octyl FF, GE Healthcare
HiTrap™ HIC Selection Kit	1 ml Phenyl FF (low sub), GE Healthcare
HiScreen Phenyl FF (low sub) 5 ml	GE Healthcare
Superdex™ 200 10/300 GL	GE Healthcare
Superose™ 6 10/300 GL	GE Healthcare
Superose™ 12 10/300 GL	GE Healthcare

Dialyseklammern	Roth
Dialyseschlauch	ZelluTrans, Ausschlussgröße 12-14 kDa, Roth
Elektroporator	Gene Pulser Xcell, Bio-RAD
Eppendorfcups 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
Falcon Tubes 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Filteraufsatz für Spritzen	Filtropur S 0.2 sterile, Sarstedt

Material

French Press	French Pressure Cell Press, American Instrument Company
Geldokumentationsanlage	Gerix 1000, Biostep
Gel-Scanner	GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-RAD
Glasperlen	1,25 – 1,55 mm, Roth
Hand counter	LB 1210 B, Berthold
Heizblock	TB1, Biometra
Hybridisierungssofen	OV3, Biometra
Inkubator	BE 400, Memmert
Kanülen	Sterican Gr.1 0,9 x 40 mm steril BL/LB, B BRAUN
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH and Co
Mikrowelle	8020 E, Privileg
Nylon Membranen	positiv geladen, Roche
PAA-Gelkammer	gebaut in der Institutswerkstatt der Universität zu Lübeck und der Philipps-Universität Marburg
PCR Cycler	TGradient, Biometra
pH-Meter	inoLab, SENTON
Pipetten	Eppendorf Research (0.1–2.5 µl, 2–20 µl, 20– 200 µl, 100–1000 µl)
Phosphoimager	Bio-Imaging Analyser BAS 1000, Fujifilm Image Reader FLA-3000, Fujifilm
Phosphoimager-Kassetten	Bas cassette 4043, Fuji Film
Photometer	Biomate 3, Thermo Spectronic
Power supply	Power N Pac 3000, Bio-RAD
Probenschleife 250 µl	Peek TM Tubing: 1,96 µl/cm, Amersham Biosciences
Probenschleife 2 ml	Amersham Biosciences
Quartzküvette	104-QS, 10 mm; Hellma
Röntgenfilm	BioMax Light Film, Kodak
Rotor-Rad	LMOM1203, Kobe
SDS-Gel-Kammer	Mini Protean® 3 Cell, Bio-RAD
Skalpell	Surgical Disposable Skalpell sterile, B BRAUN
Sonicator	Branson Sonifier 250
Spritze	250 µl Spritze Hamilton Omnifix® 20 ml steril, B BRAUN Omnifix® 50 ml steril, B BRAUN
Steril-Filteraufsatz (Spritzen)	Filtropur S 0.2 sterile, Sarstedt
sterile Vakuum-Filter	Filtropur V50 0.2 Vacuum 500 ml, Sarstedt
Superloop 10 ml	Pharmacia Biotech
Szintillationszähler	1900 CA TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyzer, Perkin Elmer
Thermomixer	Eppendorf
Ultrafree®-MC Centrifugal	
Filters 0,22 µm	Millipore
Ultrazentrifuge	Optima L-90K, Beckman Coulter
Vakuum-Filter	Filtropur V50 0.2 Vacuum 500 ml, Sarstedt
Vortexer	7-2020, NeoLab

Material

Waagen	Sartorius, DENVER Instruments
Whatman-Filterpapier	Whatman 3 MM, Bio-RAD
Zell-Homogenisierer	MPI FastPrep 24
Zentrifugen	Eppendorf 5810R, Heraeus Biofuge Fresco
Zentrifugengläser	Beckmann

Zentrifugations-Filtereinheiten

Centrifugal Unit	Filter	max. Probenvolumen	Ausschlussgröße	Firma
Amicon® Ultra – 15 10K		15 ml	10 kDa	Millipore
Amicon® Ultra – 4 100K		4 ml	100 kDa	Millipore
Amicon® Ultra – 4 10K		4 ml	10 kDa	Millipore
Amicon® Ultra – 2 50K		2 ml	50 kDa	Millipore
Amicon® Ultra – 2 10K		2 ml	10 kDa	Millipore
Amicon® Ultra – 0,5 10K		0,5 ml	10 kDa	Millipore

3.1.14 Programme, Software und Datenbanken

Autoradiographie

-Detektion	PC-BAS
-Auswertung	Aida Image Analyser 3.45
ClustalW, ClustalX	(Thompson <i>et al.</i> 2002)
EndNote X7	Thomson Reuters
Microsoft Office	Microsoft
NCBI	(NCBI-Resource-Coordinators 2014)
NCBI BLAST+	(Camacho <i>et al.</i> 2009)
Phyre2 Server	(Kelley and Sternberg 2009)
PROMALS3D	(Pei and Grishin 2014)
Protein Datenbank	(Bernstein <i>et al.</i> 1978)
R: Erstellung von Boxplots	http://www.R-project.org
Rfam	(Burge <i>et al.</i>)
RNAfold	(Lorenz <i>et al.</i> 2011)
segemehl Version 0.1.4	(Otto <i>et al.</i> 2011)
STAMP	(Russell and Barton 1992)
Unicorn 5.01	Amersham Biosciences
VMD	(Humphrey <i>et al.</i> 1996)

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine bakterielle Zellkulturarbeiten

LB-Medium (Luria Bertani)

Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH-Einstellung mit NaOH auf pH 7,5	

Die Aufzucht von *Escherichia coli*-Stämmen erfolgte mit autoklaviertem LB-Medium.

Die Präparation von Glycerinkulturen zur Langzeitlagerung erfolgte durch eine 1 : 1 Verdünnung von 500 µl-Kulturaliquots mit Glycerin (99 %), welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert wurden.

Für induzierbare Promotersysteme zur Proteinexpression wurde dem Medium IPTG (Endkonzentration 1 mM) oder L(+)-Arabinose (Endkonzentration 10 mM) hinzugefügt. Zur Selektion auf der Basis von Resistenzgenen wurden dem Medium Antibiotika zu folgenden Endkonzentrationen hinzugefügt: Ampicillin: 100 µg/ml oder Chloramphenicol: 25 µg/ml.

3.2.1.1 Bakterienanzucht in Flüssigmedium

Übernacht-Kulturen für analytische Zwecke (3 ml LB-Medium in Kulturröhrchen) wurden mit einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte oder direkt aus einer Glycerinkultur angeimpft. Die Übernacht-Kulturen wurden im Inkubator bei 200 rpm bei 37 °C für 10 – 15 h geschüttelt.

Für präparative Zwecke wurden anschließend 500 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die 500 ml-Kultur wurde für weitere 10 – 15 h bei 37 °C / 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für eine Plasmidpräparation (Maxi-Präparation, siehe 3.2.3.1) oder zur Präparation von Proteinen (siehe 3.2.5.7) verwendet.

3.2.1.1.1 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Zur Kontrolle des Wachstums von Bakterienkulturen wurde deren optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Photometer gemessen (OD₆₀₀-Wert). Als Leerwert wurde nicht angeimpftes Medium verwendet.

3.2.1.2 Bakterienanzucht auf festen Medien

Bakterienanzucht auf Agarplatten erfolgte durch Zusatz von 15 g/l Agar zum LB-Medium. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums im Wasserbad auf 50 °C wurden Antibiotika hinzugefügt und das Medium wurde in Petrischalen gegossen.

Mit einer ausgeglühten Impföse wurde ein kleiner Teil einer Glycerinkultur (Größe eines Stecknadelkopfs) auf einer Agarplatte mit der Drei-Strich-Methode ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C über Nacht.

3.2.1.3 Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Präparation wurden 500 ml LB-Medium mit einer Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nachdem die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten, wurden

Methoden

sie für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 5000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 500 ml eiskaltem Glycerin (10 % (v/v)) resuspendiert.

Nach erneuter Zentrifugation folgte ein zweiter und ein dritter Waschschrift mit je 250 ml und 50 ml Glycerin (je 10 % (v/v)). Schließlich wurde das Zellpellet in 2 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

3.2.1.4 Transformation elektrokompeter *E. coli* Zellen

SOC Medium

2 %	Pepton
0,5 %	Hefeextrakt
2,5 mM	KCl
10 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

Die pH-Einstellung erfolgte mit NaOH auf pH 7,5

Steril filtrierte Glukose und Stammlösungen der Magnesiumsalze wurden erst nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Die 200 µl-Aliquots elektrokompeter Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Jeweils 20 µl Zellen wurden mit 10 ng rekombinanter DNA versetzt, in eine 0,1 cm-Elektroporationsküvette überführt und 1 min auf Eis inkubiert.

Mittels des GenePulser Elektroporators folgte ein Puls von 1,8 kV bei 25 µF und 200 Ω für ca. 5 ms. Nach Hinzufügen von 1 ml SOC Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt. 100 µl der transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Allgemeine Nukleinsäuretechniken

Wenn nicht anders angegeben, wurden DNA- und RNA-Proben in ddH₂O gelöst. Proben wurden bis zu 6 Monate bei -20 °C gelagert. Langzeitlagerung von RNA erfolgte bei -80 °C.

Die Arbeiten mit RNA wurden möglichst auf Eis durchgeführt.

3.2.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist eine Standard-Methode, um wässrige Nukleinsäurehaltige Proben aufzureinigen. Sie wird vor allem angewandt, um Enzyme aus Reaktionsansätzen zu entfernen. Die Proteine werden durch die organischen Lösungsmittel denaturiert. Die denaturierten Proteine sammeln sich in der organischen Phase und der Grenzphase (Interphase) an. Die wässrige Phase, in welcher die Nukleinsäuren gelöst sind, wird abgenommen und abschließend mittels einer Ethanol-Fällung (3.2.2.2) von organischen Lösungsmittelresten befreit.

Für DNA-Proben wurde Phenol (pH 7,5 – 8,0) zur Extraktion verwendet, für RNA-Extraktionen Roti®-Aqua-Phenol (pH 4,5 – 5,0) von der Firma Roth.

Die Nukleinsäure-haltige Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol gemischt und 0,5 min gevortext. Dann wurde der Extraktionsansatz für 5 min bei RT in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge Fresco) bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne Bestandteile der

Methoden

proteinhaltigen Interphase mitzunehmen. Zu der abgenommenen oberen wässrigen Phase wurde 1 Volumen Chloroform (p.a.) hinzugefügt und der Ansatz wurde für 0,5 min gevortext. Nach der anschließenden Zentrifugation für 5 min bei RT in einer Tischzentrifuge bei 12000 rpm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Mit der überführten wässrigen Phase wurde dann eine Ethanol-Fällung durchgeführt (3.2.2.2.1).

3.2.2.2 Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren

Die Standard-Methode, um Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu konzentrieren, ist die Alkohol-Fällung. Dafür kann Ethanol oder Isopropanol verwendet werden.

3.2.2.2.1 Ethanol-Fällung

Zur Fällung wurde die Nukleinsäure-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol abs. versetzt. Zusätzlich wurde noch 1 µl Glycogen (20 mg/ml) hinzugefügt. Der Fällungsansatz wurde kurz gevortext und dann für 1 h auf -20 °C gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 1 h bei 4 °C und 11000 x g und daraufhin die Abnahme des Überstandes. Nach dem Lufttrocknen des Pellets bei RT für 5 min wurde dieses in einem angemessenen Volumen ddH₂O gelöst.

Wenn der Fällungsreaktion eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) vorausging, wurde das Nukleinsäurepellet nach der Zentrifugation zusätzlich in 1 Vol. eiskaltem EtOH (70 % (v/v)) gewaschen, um Salz- und Alkoholreste und andere wasserlösliche Substanzen zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation (11000 x g, 30 min, 4 °C) wurde das Pellet in einem angemessenen Volumen ddH₂O gelöst.

3.2.2.2.2 Isopropanol-Fällung

Isopropanol fällt Nukleinsäuren effektiver, deswegen genügt ein geringeres Volumen dieses Alkohols, um eine quantitative Fällung zu erreichen. Aus dem Grund eignet sich die Isopropanol-Fällung insbesondere bei großvolumigen Fällungsansätzen. Nachdem 0,8 bis 1 Probenvolumen Isopropanol, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) und 1 µl Glycogen (20 mg/ml) zur Nukleinsäure-haltigen Lösung hinzugefügt wurden, wurde der Fällungsansatz kurz gevortext und für 1 h auf -20 °C gestellt. Nach der Zentrifugation (11000 x g, 4 °C) wurde das Pellet mit 1 Vol. eiskaltem EtOH (70 % (v/v)) gewaschen, um restliche Salze bzw. restliches Isopropanol zu entfernen. Schließlich wurde das Pellet in einem angemessenen Volumen ddH₂O gelöst.

3.2.2.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

3.2.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

5x TBE-Puffer		1x TBE-Puffer
445 mM	Tris	1x TBE-Puffer wurde durch eine
445 mM	Borsäure	1 : 5 Verdünnung von 5x TBE-
10 mM	EDTA	Puffer mit demin. H ₂ O hergestellt.

Methoden

5x DNA-Probenpuffer

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanolblau
25 % (w/v)	Glycerin
In 5x TBE-Puffer, pH 8	

Tabelle 3.1: Trennbereich von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Agarose (w/v)	Fragmentlänge (kB)
0,5 %	1 – 30
0,7 %	0,8 - 12
1,0 %	0,5 – 7
1,2 %	0,4 – 6
1,5 %	0,2 – 3
2,0 %	0,1 – 2

Agarose-Gelelektrophoresen wurden zur Analyse und Auftrennung von DNA-Proben verwendet. Die Herstellung von Agarosegelen erfolgte durch Lösen der entsprechenden Menge Agarose in 1x TBE-Puffer. Die Menge der Agarose wurde entsprechend der erwarteten Größe des aufzutrennenden DNA-Fragments gewählt. Die Puffer/Agarose-Mischung wurde in einem Mikrowellen-Gerät erhitzt und von Zeit zu Zeit geschwenkt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren und die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 2 Tropfen einer Ethidiumbromid-Stammlösung (250 µg/µl) pro 50 ml Agarose-Lösung und erneutem Schwenken wurde die Lösung in eine Gelschlitten-Vorrichtung mit Kamm gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt (Verhältnis Probe : 5x Probenpuffer = 4 : 1). Parallel wurde ein kommerzieller DNA-Größenmarker aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet, die Elektrophorese erfolgte bei 60 - 120 mA.

3.2.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), denaturierend

5x TBE-Puffer		1x TBE-Puffer
445 mM	Tris	1x TBE-Puffer wurde durch eine
445 mM	Borsäure	1 : 5 Verdünnung von 5x TBE-
10 mM	EDTA	Puffer mit demin. H ₂ O hergestellt.

PAA-Gel Stammlösung 20 %		2x RNA-Probenpuffer	
5x TBE-Puffer	1x	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
PAA 50 % (48 : 2)	20 %	0,02 % (w/v)	Xylencyanolblau
Harnstoff	8 M	2,6 M	Harnstoff
demin. H ₂ O	ad 1 Liter	66 % (v/v)	Formamid
		in 2x TBE Puffer pH 8,0	

Die PAA-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und Auftrennung von RNA-Proben verwendet. Die Polymerisationsreaktion von Polyacrylamid (PAA) wird durch Zugabe von TEMED (Katalysator) und 10 % (w/v) APS (Radikalstarter) initiiert. Der Grad der Quervernetzung im Gel ist vom Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid (standardmäßig wurde ein Stammlösung von 48 : 2 verwendet) abhängig. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration des Acrylamids (5 % - 20 %) bestimmt. Je nach Größe der zu analysierenden

Methoden

und zu trennenden Nukleinsäurefragmente wurde ein PAA-Gel entsprechender Konzentration präpariert.

Tabelle 3.2: Komigration einzelsträngiger DNA-Fragmente (in Nukleotiden) mit den Farbstoffen Xylencyanolblau (XCB) und Bromphenolblau (BPB) bei unterschiedlichen PAA-Gelkonzentrationen

PAA-Gelkonzentration	BPB (Nt)	XCB (Nt)
5 %	35	130
8 %	19	70 – 80
10 %	12	55
20 %	8	25

PAA-Gel	20 %	10 %	8 %	5 %
20 % PAA-Stammlösung	60 ml	30 ml	24 ml	15 ml
ddH ₂ O	-	30 ml	36 ml	45 ml
TEMED	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl
APS	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl

Nach Initiation der Polymerisationsreaktion wurde die Gellösung zwischen zwei gut gesäuberte Glasplatten gegossen, die durch 1 mm dicke Platzhalter („Spacer“) am unteren, linken und rechten Rand auf Abstand zueinander gehalten wurden. An der oberen (freien) Seite wurde ein Kamm zwischen die Glasplatten in die Gellösung gesteckt. Nachdem das Gel auspolymerisiert und ausgehärtet war, wurden der Kamm und der untere Spacer entfernt. Das Gel wurde in eine Gelkammer gespannt, deren obere und untere Gelkammer mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer befüllt wurden, so dass die Probenaschen und die untere Gelseite (frei von Luftblasen) in vollständigem Kontakt mit dem Laufpuffer waren.

Bevor die Proben – im Verhältnis 1 : 1 mit denaturierendem 2x RNA-Probenpuffer versetzt – in die Geltaschen aufgetragen wurden, wurden diese mittels einer Spritze mit Laufpuffer gespült.

Für Enzymtests auf RNase P-Aktivität (3.2.6.2) wurden zur Analyse der endonukleolytisch abgespaltenen 14 nt-Flanke 20 % PAA-Gele verwendet. 8 % und 10 % PAA-Gele wurden vor allem bei Northern Blot-Experimenten angefertigt.

Je nach Gelformat und PAA-Konzentration der Gele wurde die Elektrophorese bei 15 – 35 mA durchgeführt.

3.2.2.4 Detektion von Nukleinsäuren in Gelen

3.2.2.4.1 Ethidiumbromid-Färbung

Bei der Herstellung von Agarosegelen wurde Ethidiumbromid der Gellösung bereits vor dem Gießen hinzugefügt (3.2.2.3.1).

PAA-Gele wurden nach der Elektrophorese für 5 – 10 min bei RT in einer Ethidiumbromid-Färbelösung geschwenkt (1x TBE-Puffer mit 40 µg/100 ml Ethidiumbromid).

Bei Anregungswellenlängen von 254 - 366 nm wurde die emittierte Fluoreszenz (590 nm) in einer Geldokumentationsanlage detektiert und dokumentiert.

3.2.2.4.2 UV-Detektion

Nukleinsäuren absorbieren Licht im Bereich von 260 nm. Zur Detektion von Nukleinsäuren in PAA-Gelen für präparative Zwecke wurden nach der Elektrophorese die Glasplatten von den

Methoden

Gelen abgenommen. Daraufhin wurden die PAA-Gele in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf eine Dünnschicht-Chromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator unter eine UV-Lichtquelle (254 nm) gelegt. Die Nukleinsäure-Bande erschien auf dem Hintergrund der Chromatographieplatte als dunkler Schatten. Nachdem die Position der Nukleinsäure-Bande mit einem Stift auf der Folie markiert worden war, wurde das markierte Gelstück mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und zur Gelelution vorbereitet.

3.2.2.4.3 Autoradiographie

Radioaktiv markierte RNA (3.2.4.5.1) wurde nach der PAA-Gelelektrophorese (3.2.2.3.2) mit Hilfe eines Phosphoimagers im Gel detektiert. Dafür wurde eine Imager-Platte auf ein (in Klarsichtfolie eingeschlagenes) PAA-Gel mit radioaktiv markierter RNA gelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht. Zur Detektion präparativer Mengen radioaktiv markierter RNA nach der Gelaufreinigung eines RNA- 5'- $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP Markierungsansatzes wurde eine Expositionszeit von etwa 1 min benötigt.

Die exponierten Imager-Platten wurden mit einem Phosphoimager (Bio-Imaging Analyser BAS 1000, Fujifilm) detektiert und mit der Software AIDA Image Analyzer quantifiziert.

3.2.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung des Leerwerts wurde ein der Probe entsprechendes Volumen des Puffers verwendet, in welchem die zu analysierende Nukleinsäure gelöst war.

Grundlage der Absorptionsmessung ist das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

E = Extinktion

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Nukleinsäure

d = Schichtdicke der Küvette

Die Absorption der Nukleinsäure wurde in einer Quarzküvette bei 260 nm im Verhältnis zum Leerwert bestimmt. Mit Hilfe gegebener Nukleinsäure-Konzentrationen, welche einer Absorptionseinheit von 1 bei 260 nm entsprechen (1 A_{260}), lässt sich die Nukleinsäurekonzentration der Probe wie folgt bestimmen:

Eine Absorptionseinheit bei 260 nm (1 A_{260}) entspricht folgender Nukleinsäuremenge:

(1 A_{260}) dsDNA = 50 $\mu\text{g/ml}$

(1 A_{260}) ssDNA = 37 $\mu\text{g/ml}$

(1 A_{260}) RNA = 40 $\mu\text{g/ml}$

Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$C_{\text{Probe}} = \frac{A_{260} \times (1 A_{260}) \times V_f}{1000}$$

C_{Probe} = Konzentration der Probe ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

V_f = Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe

3.2.3 DNA-Methoden

3.2.3.1 Plasmidpräparation

Zur präparativen Aufreinigung (Maxi-Präparation) von Plasmid-DNA wurde das Kit „Nucleobond®“ der Firma Macherey-Nagel mit „AX 500“-Anionenaustauscher-Säulen verwendet. Die Plasmidaufreinigung erfolgte nach Hersteller-Angaben.

3.2.3.2 Restriktionsverdau

Restriktionsverdaus wurden hauptsächlich zur Linearisierung von Plasmiden für anschließende *in vitro* Transkriptionen durchgeführt, entweder im analytischen (10 µl) oder präparativen (250 µl) Maßstab:

Reaktionsansatz	analytisch	präparativ
DNA	0,5 µg	125 – 250 µg
10x Restriktionspuffer	1 µl	25 µl
Restriktionsenzym	1 µl	25 µl
ddH₂O	ad 10 µl	ad 250 µl
Inkubation	60 min, 37 °C	über Nacht, 37 °C

Anschließend erfolgte die Analyse des Restriktionsverdaus mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2.3.1).

3.2.3.3 DNA-Aufreinigung

3.2.3.3.1 Aufreinigung genomischer DNA

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

Lysozym-Lösung: 20 mg/ml Lysozym in TE-Puffer

Zur Präparation genomischer DNA von *A. aeolicus* wurde ein Zellpellet von der Größe eines Stecknadelkopfes in 300 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde eine Methode verwendet, welche den Einsatz von Natriumperchlorat beinhaltet (Sambrook 2001). Nach Hinzufügen von 30 µl Lysozymlösung wurde der Ansatz 10 min bei 37 °C inkubiert.

Es folgte die Zugabe von 100 µl SDS-Lösung (10 %), 100 µl Natriumperchlorat-Lösung (5 M) und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24 : 1). Der Ansatz wurde 30 s mit der Hand geschüttelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge Fresco) bei RT wurde die obere wässrige Phase abgenommen (etwa 400 µl) und mit 800 µl eiskaltem Ethanol (99 %) gefällt. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde die sichtbare DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl EtOH 70 % gewaschen.

Im Anschluss an die Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, RT) wurde das DNA-Pellet für 5 min luftgetrocknet, in 300 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.3.2 Agarosegel-Elution

Zur Separation definierter DNA-Fragmente von größeren oder kleineren DNA-Molekülen wurden entsprechende Gemische in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.2.3.1). Nach post-elektrophoretischer Detektion (3.2.2.4.1) wurde der gewünschte DNA-Fragmentbereich mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, sein Gewicht bestimmt, und die DNA mit dem Kit „QIAquick® PCR Purification Kit“ nach Hersteller-Anleitung eluiert.

3.2.3.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die enzymatische Amplifikation geringer Mengen an DNA. Zur exponentiellen Vervielfältigung wird eine thermostabile DNA-Polymerase und ein wenig Ausgangs-DNA, die als Matrize (Templat) dient, benötigt. Desweiteren werden zwei zum Templat komplementäre und im Überschuss vorliegende DNA-Oligonukleotide (Primer) als Polymerisationsstarter sowie Desoxynukleosidtriphosphate und ein Mg^{2+} -haltiger Reaktionspuffer benötigt. PCR-Reaktionen wurden entweder nach einem Standard-Protokoll oder - zur Amplifikation GC-reicher DNA - mit Hilfe des Kits „Long PCR Enzyme Mix“ von Thermo Scientific durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die PCR hauptsächlich zur Amplifikation kurzer (< 400 Nt) DNA-Sequenzen eingesetzt. Für PCR-Reaktionen nach einem Standard-Protokoll wurde vorwiegend die *Taq* DNA-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* verwendet. Die DNA-Syntheserate ist je nach verwendeter DNA-Polymerase verschieden. Die Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-Polymerase liegt bei zirka 1000 Nukleotide/30 - 60 s.

3.2.3.4.1 Standard-PCR

Standard PCR-Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge
genomische DNA/Plasmid-DNA	x µl	500 ng/10 ng
10x PCR-Reaktionspuffer (- $MgCl_2$) Thermo Scientific	5 µl	
$MgCl_2$ 25 mM	x µl	2 - 5 mM *
10 mM dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)	2 µl	0,1 mM je dNTP
Primer 1 100 pmol/µl	0,5 µl	1 µM
Primer 2 100 pmol/µl	0,5 µl	1 µM
ddH ₂ O ad 49 µl	ad 49 µl	-
kommerzielle Polymerase (5 U/µl) oder laborinterne Präparation	1 µl	

* Bei nicht zufriedenstellender Produktbildung wurde die Mg^{2+} -Konzentration angepasst.

Programmschritt	Standard PCR- Programm zur Amplifizierung	T (°C)	Zeit (s)
1	Initiale Denaturierung	94	150
2	Denaturierung	94	40
3	T_{Anneal}	45 – 65 *	30
4	Elongation	72	45 - 90 **
Die Schritte 2 - 4 wurden zur Amplifikation 30 mal wiederholt			
5	finale Elongation	72	300

* Die Annealing-Temperatur T_{Anneal} des PCR-Programms wurde so gewählt, dass sie 5 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer lag. Bei der Entstehung von Nebenprodukten wurde die Annealing-Temperatur um bis zu 2 °C erhöht.

** Die Elongationszeit wurde der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase und der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz angepasst.

Methoden

3.2.3.4.2 Amplifikation GC-reicher DNA

Zur Amplifikation GC-reicher DNA wurde das Kit „Long PCR Enzyme Mix“ von Thermo Scientific verwendet. Das folgende Protokoll für den Long PCR Enzyme Mix-Reaktionsansatz orientiert sich an den Hersteller-Empfehlungen.

Long PCR Enzyme Mix-Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge
genomische DNA	x µl	500 ng
10x Long PCR Buffer (- MgCl ₂)	5 µl	1x
MgCl ₂ 25 mM	x µl	1,5 - 2,5 mM *
10 mM dNTP-Mix (2,5 mM je NTP)	3 µl	0,15 mM je dNTP
Primer 1 100 pmol/µl	0,5 µl	1 µM
Primer 2 100 pmol/µl	0,5 µl	1 µM
DMSO (100 %)	1,5 µl	3 %
ddH ₂ O	ad 49,5 µl	-
Long PCR Enzyme Mix	0,5 µl	

* Bei nicht zufriedenstellender Produktbildung wurde die Mg²⁺-Konzentration angepasst.

Die Amplifikation erfolgte mit dem Standard-PCR Programm.

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes (1 - 2 µl) auf einem Agarosegel analysiert.

3.2.4 RNA-Methoden

3.2.4.1 Total RNA-Extraktion

Extraktionspuffer

10 mM	NaOAc pH 4,8
150 mM	Saccharose

Ein Zellpellet von *A. aeolicus* Zellen in der zweifachen Größe eines Stecknadelkopfs wurde in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Die RNA wurde nach der „Hot Phenol Methode“ (Mattatall and Sanderson 1996) extrahiert, jedoch ohne Zusatz von Lysozym. Zu dem Zellpellet wurden 3 ml kalter Extraktionspuffer hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für 10 min auf Eis in dem Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 333 µl SDS-Lösung (10 %) hinzugefügt und der Ansatz kurz gevortext. Es folgte die Zugabe von 3 ml Roti®-Aqua-Phenol zur RNA-Extraktion, welches zuvor im Wasserbad auf 65 °C vorgewärmt worden war. Der Ansatz wurde gevortext und für 5 min bei 65 °C in Wasserbad inkubiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min und im Anschluss daran eine Zentrifugation für 20 min bei 11000 x g und 4 °C. Nach der Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) und einer abschließenden Ethanol-Fällung (3.2.2.2.1). Das RNA-Pellet wurde in ddH₂O aufgenommen.

3.2.4.2 *In vitro* Transkription

Zur RNA-Synthese *in vitro* wurde die T7 RNA-Polymerase (T7 RNAP) aus dem Bakteriophagen T7 verwendet. Diese DNA-abhängige RNA-Polymerase besteht aus einem monomeren Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Die T7 RNAP ist hochspezifisch für den T7-Promoter (5'-TAATACGACTCACTATA-3'). Für eine effiziente

Methoden

Transkription ist es erforderlich, dass die ersten beiden Positionen des RNA-Transkripts Guanosin-Nukleotide (G+1 und G+2) sind.

Zur Herstellung von RNA-Transkripten definierter Länge wurde die sogenannte „Run-off“ Transkription durchgeführt. Dazu wurde das Templat zuvor mit einem Restriktionsenzym geschnitten, so dass die T7 RNAP bis zur Schnittstelle transkribiert und anschließend vom Matrizenstrang abfällt.

Als DNA-Templat wurden aufgereinigte PCR-Produkte oder linearisierte, aufgereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. *In vitro* Transkriptionen wurden entweder nach einem Standard-Protokoll oder – zur Transkription GC-reicher RNA – mit Hilfe des Kits „T7 High Yield Transcription Aid Kit“ der Firma Thermo Scientific durchgeführt.

Sollten die *in vitro* Transkripte im Nachhinein phosphoryliert werden (z.B. im Rahmen einer radioaktiven 5'-Markierung mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3.2.4.5.1)), so musste ein RNA-Transkript mit einem freien 5'-OH Ende generiert werden. Dies geschah entweder durch Zugabe von Guanosin zum Reaktionsansatz - in 9-fachem molaren Überschuss zum GTP. Alternativ wurde das Transkript nach der *in vitro* Transkription dephosphoryliert (3.2.4.4).

Kleinere analytische Ansätze wurden im 50 µl-Maßstab angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Für präparative Ansätze im 500 µl-Maßstab wurde eine 2 Schritt-Inkubation durchgeführt, bei welcher nach 2-stündiger Inkubation ein weiteres Aliquot RNA-Polymerase hinzugefügt wurde. Danach wurde der Ansatz für weitere 2 h bei 37°C inkubiert.

Standard <i>in vitro</i> Transkriptionsansatz	analytisch	präparativ	Endkonzentration/ Gesamtmenge
1M HEPES pH 8	4 µl	40 µl	80 mM
100 mM DTT	7,5 µl	75 µl	15 mM *
3 M MgCl ₂	0,33 µl	3,3 µl	20 mM **
DMSO (100 %)	0,75 µl	7,5 µl	1,5 % ***
100 mM Spermidin	0,5 µl	5 µl	1 mM
100 mM NTP-Mix (25 mM je NTP)	8 µl	80 µl	16 mM (4 mM je NTP)
DNA-Templat	4 µg	40 µg	80 ng/µl
Pyrophosphatase 200 U/ml	0,5 µl	5 µl	0,1 U insgesamt
30 mM Guanosin **** (vorgewärmt auf 75 °C)	15 µl	150 µl	9 mM
T7 RNA-Polymerase (Eigenpräparation)	1 µl	10 µl	-
ddH ₂ O	ad 50 µl	ad 500 µl	-
Inkubation	2 h 37 °C	2 h 37 °C	
T7 RNA-Polymerase (Eigenpräparation)	-	10 µl	-
Inkubation		2 h 37 °C	

Folgende Konzentrationen wurden bei geringer Transkriptionseffizienz angepasst:

* DTT (Endkonzentration 5 - 15 mM)

** MgCl₂ (Endkonzentration 15 - 30 mM)

*** DMSO (Endkonzentration 1 - 3 %)

**** Optional zur Herstellung von Transkripten mit 5'-OH Ende.

Im Anschluss an die analytische *in vitro* Transkription wurde ein Aliquot auf einem PAA-Gel analysiert. Bei erfolgreicher Transkription wurden präparative Ansätze hergestellt und im Anschluss Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1). Nach Ankonzentrierung mittels Ethanol-Fällung (3.2.2.2.1) wurde das RNA-Transkript zur Eliminierung von Nebenprodukten per

Methoden

denaturierender PAA-Gelelektrophorese aufgereinigt (3.2.4.3). Nach der darauffolgenden Gelelution und Ethanol-Fällung wurde die RNA in ddH₂O oder in Puffer A10 aufgenommen und ihre Konzentration wurde bestimmt (3.2.2.5).

3.2.4.2.1 *In vitro* Transkription GC-reicher RNAs

GC-reiche Template wurden mit dem „T7 High Yield Transcription Aid Kit“ der Firma Thermo Scientific transkribiert. Die *in vitro* Transkription GC-reicher Template wurde ebenfalls als 2 Schritt-Inkubation durchgeführt.

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration/ Gesamtmenge
5x Transcription Aid Buffer	4 µl	1x
100 mM NTP-Mix	8 µl	10 mM je NTP
DMSO (100 %)	0,3 - 0,6 µl	1,5 – 3 % *
Templat	x µl	1,5 µg
High Yield RNA-Polymerase	2 µl	
ddH ₂ O	ad 20 µl	-
Inkubation	1,5 h 37 °C	
High Yield RNA-Polymerase	1 µl	
Inkubation	1,5 h 37 °C	

* Bei geringer Transkriptionseffizienz wurde die DMSO-Konzentration angepasst (1 - 3 %).

Der 20 µl-Ansatz führte in der Regel zu sehr hohen Ausbeuten, so dass schon 1 Reaktionsansatz ausreichend war, um nach der Aufreinigung des *in vitro* Transkripts genügend RNA für weitere analytische Zwecke zur Verfügung zu haben. Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes wurde analog der eines Standard *in vitro* Transkriptionsproduktes durchgeführt (s.o).

3.2.4.3 RNA-Aufreinigung mittels PAA-Gelelektrophorese

RNA-Produkte der gewünschten Größe wurden mittels denaturierender PAA-Gelelektrophorese (siehe 3.2.2.3.2) von längeren oder kürzeren Nebenprodukten abgetrennt. Je nach Größe des aufzureinigenden RNA-Fragments wurde ein PAA-Gel entsprechender Konzentration präpariert (siehe Tabelle 3.2 in 3.2.2.3.2) und die Dauer der Elektrophorese so eingestellt, dass eine möglichst optimale Gel-Auftrennung gewährleistet war. Die entsprechende RNA wurde unter UV-Licht detektiert und markiert (3.2.2.4.2). Es folgte eine PAA-Gelelution (3.2.4.3.1) mit anschließender Ethanol-Fällung.

3.2.4.3.1 PAA-Gelelution

Im Anschluss an PAA-Gelelektrophorese und UV-Detektion (3.2.2.4.2) bzw. Autoradiographie (3.2.2.4.3) wurde das Gelstück mit der zu eluierenden Nukleinsäure mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Es wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und ein entsprechendes Volumen Natriumacetat-Lösung (1 M, pH 5) hinzugefügt, so dass das Gelstück im Reaktionsgefäß mit der Lösung bedeckt war. Die Elution erfolgte bei 4 °C und leichtem Schütteln (150 - 200 rpm) über Nacht. Anschließend wurde die RNA aus dem Eluat per Alkohol-Fällung (3.2.2.2) ankonzentriert.

3.2.4.4 Dephosphorylierung

Um freie 5'-OH Enden bei Nukleinsäuren für Phosphorylierungsreaktionen zu generieren, wurden diese dephosphoryliert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde mit Alkalischer Phosphatase (AP, Thermo Scientific) durchgeführt.

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration
RNA-Templat	-	0,2 – 0,5 µg/µl
10x FAST AP Puffer	3 µl	1x
Fast AP 1U/µl	3 µl	0,3 U/µl
ddH ₂ O	ad 30 µl	-
Inkubation	2 h 37 °C	

Im Anschluss wurde eine Hitzeinaktivierung der AP nach Herstellerangaben durchgeführt. Alternativ wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) mit abschließender Ethanol-Fällung (3.2.2.2.1) durchgeführt.

3.2.4.5 Phosphorylierung

Einzel- und doppelsträngige DNA und RNA kann durch die Polynukleotid-Kinase des *E. coli*-Phagen T4 phosphoryliert werden. Die T4 PNK katalysiert die Übertragung eines γ -Phosphats von ATP auf die 5'-OH-Gruppe der Nukleinsäure. Die T4 PNK kann auch in einer umgekehrten Reaktion eine 5'-Phosphat-Gruppe von einer Nukleinsäure auf ADP übertragen. Bei der radioaktiven 5'-Markierung von DNA oder RNA wird zur Phosphorylierung $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP eingesetzt (siehe unten, 3.2.4.5.1).

Phosphorylierungsansatz	Volumen (Endkonzentration)
RNA	x µl (1µg)
10x T4 PNK-Puffer A (Thermo Scientific)	1,5 µl (1x)
DTT 25 mM	1,5 µl (2,5 mM)
ATP Stammlösung 100 mM	0,3 µl (2 mM)
T4 PNK 10 U/µl (Thermo Scientific)	1 µl (0,67 U/µl)
ddH ₂ O	ad 15 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Eine weitere Behandlung des Reaktionsansatzes (z.B Inaktivierung oder Aufreinigung) erfolgte nicht, da die nicht-radioaktive Phosphorylierung in der vorliegenden Arbeit nur bei RNA-Oligonukleotiden durchgeführt wurde, die als Größenmarker und Positivkontrollen in Northern Blot-Analysen eingesetzt wurden.

3.2.4.5.1 Radioaktive Markierung von RNA

Radioaktive 5'-Markierung von RNA wurde mittels einer Phosphorylierungsreaktion mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt. Die Phosphorylierung erfolgte mit T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK, Thermo Scientific).

Methoden

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration
10x T4 PNK Puffer A (Thermo Scientific)	1,5 µl	1x
25 mM DTT	1,5 µl	2,5 mM
RNA-Templat	x µl	10 – 30 pmol insgesamt
ddH ₂ O	ad 10,5 µl	-
T4 PNK (10 U/µl)	1,5 µl	1 U/µl
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol)	3 µl	-
Total	15 µl	
Inkubation	1 h 37 °C	

Nach der Inkubation des Reaktionsansatzes wurde 1 Vol. 2x RNA-Probenpuffer hinzugefügt. Es folgten eine denaturierende PAA-Gelelektrophorese (3.2.2.3.2) zwecks Aufreinigung sowie die Detektion der RNA (3.2.2.4.3). Die Gelbande wurde ausgeschnitten und über Nacht eluiert (3.2.4.3.1). Am darauffolgenden Tag wurde die RNA mittels Ethanol-Fällung (3.2.2.2.1) konzentriert und in 10 µl ddH₂O gelöst. Die Quantität der radioaktiven Markierung der RNA wurde mit einem Szintillationszähler bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde 1 µl einer $\gamma^{32}\text{P}$ -markierten Prä-tRNA gemessen.

3.2.4.6 RNA-Präparationen

3.2.4.6.1 Präparation der *E. coli* RNase P RNA

Hierfür wurde das Plasmid pJA2' verwendet, das die RNase P RNA von *E. coli* unter Kontrolle des T7-Promotors kodiert (Vioque *et al.* 1988). Nach der Plasmidlinearisierung mit dem Restriktionsenzym *Fok* I erfolgte eine präparative *in vitro* Transkription (3.2.4.2) mit anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) und PAA-Gelaufreinigung (3.2.4.3).

3.2.4.6.2 Präparation der Prä-tRNA^{His}

Für die Herstellung der Prä-tRNA^{His} von *E. coli* mittels *in vitro* Transkription wurde das mit *Bbs* I linearisierte Plasmid pEc595 (Sun *et al.* 2006) verwendet. Nach präparativer *in vitro* Transkription (3.2.4.2) wurde der Ansatz einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1), einer Isopropanolfällung (3.2.2.2.2) sowie einer PAA-Gelaufreinigung (3.2.4.3) unterworfen.

3.2.4.6.3 Präparation der 6S-1 RNA

Die 6S-1 RNA von *B. subtilis* (Plasmid pBB1) wurde wie beschrieben präpariert (Beckmann 2010). Die durchgeführten Methoden entsprechen denen, die zur Präparation der *E. coli* RNase P RNA und der Prä-tRNA^{His} angewandt wurden.

3.2.4.7 Northern Blot-Analyse nicht-kodierender RNAs in *A. aeolicus*

20x SSC-Puffer		Stringenz 1-Puffer	
3 M	NaCl	0,1 % (w/v)	SDS
0,3 M	Natriumcitrat	in 2x SSC-Puffer	
pH 7			

Methoden

Stringenz 2-Puffer		Detektionspuffer	
0,1 % (w/v)	SDS	0,1 M	Tris/HCl pH 9,5
in 0,1x SSC-Puffer		0,1 M	NaCl

Die Durchführung der Northern Blots erfolgte im Wesentlichen in Anlehnung an die in der Publikation von Beckmann *et al.* (2010) beschriebenen Methode, die speziell für kleine RNAs entwickelt wurde.

3.2.4.7.1 Gelelektrophorese und Blotting

Die Gelelektrophorese der zu blottenden RNA wurde in einer Gelapparatur für Proteingele („Mini PROTEAN® 3 cell“, Bio-RAD) mit 8 % bzw. 10 % denaturierenden PAA Mini-Gelen durchgeführt. Alle Proben wurden kurz vor der PAA-Gelelektrophorese in RNA-Probenpuffer 5 min bei 90 °C erhitzt, anschließend sofort auf Eis gestellt und nach 3 min kurz anzentrifugiert. *A. aeolicus* Total-RNA wurde in Mengen von 15 – 25 µg pro Spur aufgetragen. Von den Positiv- und Negativ-Kontrollen wurden standardmäßig 0,1 – 20 ng RNA aufgetragen (Ausnahme: die Positivkontrolle der putativen RNase P RNA aus *A. aeolicus* musste in Mengen von bis zu 680 ng RNA pro Spur aufgetragen werden). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die RNAs mittels *Semi-Dry* Blot-Verfahren in TBE-Puffer (TBE-Puffer: siehe 3.2.2.3.2) über Nacht auf eine Nylonmembran geblottet. „Whatman 3 MM“ - Filterpapier (1,5 mm dick) und die positiv geladene Nylonmembran (Roche) wurden hierfür auf die gleichen Maße des PAA-Gels zugeschnitten und in 0,5x TBE-Puffer getränkt. Die einzelnen Komponenten wurden wie folgt angeordnet: Anode – 1x Filterpapier - Nylonmembran - Gel - 1x Filterpapier - Kathode. Das Blotten der RNA auf die Membran erfolgte bei 0,36 mA/cm² über Nacht. Nach dem Blotten wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden (Crosslinking). Dies geschah entweder durch halbstündige Inkubation der Membran bei 80 °C im Hybridisierungssofen oder durch ein nasschemisches Crosslinking. Das nasschemische Verfahren mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) wurde für RNAs < 70 Nt angewandt wie beschrieben (Beckmann *et al.* 2010). Die EDC-Lösung musste unmittelbar vor dem Crosslinking frisch hergestellt werden: Zunächst wurden 245 µl 1-Methylimidazol (12,5 M) zu 8 ml ddH₂O pipettiert und der pH wurde mit HCl auf 8 eingestellt. Dann wurde 0,75 g EDC dazugegeben, die Lösung mit ddH₂O auf 24 ml aufgefüllt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Membran auf ein mit EDC-Lösung getränktes Whatman-Filterpapier (1,5 mm dick) in eine Schale gelegt. Dabei durfte die RNA auf der Oberseite der Membran nicht in direkten Kontakt mit der EDC-Lösung kommen. In Folie eingeschweisst erfolgte die Inkubation der Membran für 2 h bei 60 °C im Hybridisierungssofen. Danach wurde die Membran beidseitig kurz mit demin. H₂O abgespült und zur Lagerung aufgerollt in einem 50 ml-Falcon Tube bei 4 °C gelagert. Die Lagerung von Membranen, welche bei 80 °C gecrosslinkt wurden, erfolgte bei RT.

3.2.4.7.2 Hybridisierung und Detektion

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte mit Digoxigenin-markierten Nukleinsäure-Sonden (Herstellung siehe 3.2.4.9.4), die komplementär zur jeweils gesuchten RNA waren. Die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden wurde über Nacht bei standardmäßig 68 °C im Hybridisierungssofen durchgeführt. Zur Vermeidung unspezifischer Signale bzw. zur Verbesserung der Hybridisierung wurde die Temperatur gegebenenfalls um bis zu 5°C erhöht bzw. erniedrigt. Bei Verwendung chemisch synthetisierter LNA-modifizierter DNA-

Methoden

Sonden wurde bei der Bestimmung der Hybridisierungstemperatur die vom Hersteller angegebene Schmelztemperatur berücksichtigt. Zunächst wurde das 50 ml-Falcon Tube mit der darin gelagerten Membran im Hybridisierungssofen auf die entsprechende Hybridisierungstemperatur vorgewärmt. Parallel wurden 2 x 6 ml Hybridisierungslösung (DIG Hyb Granules, Roche; gelöst nach Herstellerangaben) vorgewärmt. Anschließend wurden 6 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung in das Tube mit der Membran überführt. Die Membran wurde dann für 1 - 2 h unter langsamer Rotation im Ofen prähybridisiert. Für die anschließende Hybridisierung wurde die Sonde zunächst 5 min bei 90 °C erhitzt und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach 1 min wurde die Sonde kurz anzentrifugiert und zu 6 ml frischer, vorgewärmter Hybridisierungslösung pipettiert. Von den eigens hergestellten Digoxigenin-markierten Sonden (siehe 3.2.4.9.4) wurden jeweils 3,5 - 5 µl und von den chemisch synthetisierten Digoxigenin-modifizierten LNA-/DNA-Sonden jeweils 300 – 400 pmol zur Hybridisierung eingesetzt. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch die frische Hybridisierungslösung mit der enthaltenen Sonde ersetzt. Bei langsamer Rotation wurde die Membran über Nacht im Hybridisierungssofen mit der Sonde inkubiert.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die folgenden Inkubations- und Wasch-Schritte unter Verwendung des Dig Wash and Block Buffer Sets (Roche) alle unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur durchgeführt, wenn nicht anders angegeben. Zunächst wurden die Membranen 2 x für 5 min in Stringenz 1-Puffer gewaschen und danach bei 68 °C für 2 x 15 min in Stringenz 2-Puffer geschwenkt. Daraufhin wurden die Membranen 3 min in ddH₂O gewaschen, bevor sie für 30 min in Blockier-Lösung (1 : 10 verdünnt in Maleinsäure-Puffer) inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in einer frisch angesetzten Blockierlösung mit einer 1 : 10.000-Verdünnung der Anti-Digoxigenin-AP Fab Antikörper (Roche) für 30 min. Dann wurden die Membranen 2 x für 15 min in Waschpuffer geschwenkt und zuletzt für 5 min in Detektionspuffer äquilibriert.

Zur Immunodetektion wurde die Membran auf PVC-Folie gelegt und mit 1 ml einer 1 : 2000 Verdünnung von CDP-Star (Roche) in Detektionspuffer gleichmäßig und vollständig benetzt, in Folie eingeschweisst und für mindestens 5 min bei RT inkubiert. Zur Detektion wurde ein Röntgen-Film aufgelegt und für 5 bis 120 min exponiert. Die Entwicklung des Röntgen-Films (Kodak) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.4.7.3 Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen

Als Positivkontrollen dienten *in vitro* Transkripte der zu analysierenden RNA-Varianten, als Negativ-Kontrollen wurden die entsprechenden *antisense* Transkripte verwendet (siehe Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)). Zur Herstellung der als Kontrollen verwendeten RNAs wurde hauptsächlich der kommerzielle „T7 High Yield Transcription Aid Kit“ (Thermo Scientific) verwendet. Die Template für die *in vitro* Transkription wurden mit dem Kit „Long PCR Enzyme Mix“ (Thermo Scientific) von genomischer *A. aeolicus* DNA PCR-amplifiziert und mittels Agarosegel-Elution (3.2.3.3.2) bzw. Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) aufgereinigt. Zur Überprüfung der Transkriptionseffizienz wurden die Transkripte mittels denaturierender PAA-Gelelektrophorese (3.2.2.3.2) analysiert. Dabei wurden GC-reiche RNAs unmittelbar vor der Gelelektrophorese 5 min bei 90 °C in RNA-Probenpuffer erhitzt. Bei erfolgreicher *in vitro* Transkription wurde der Transkriptionsansatz Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1), Ethanol-gefällt (3.2.2.2.1) und PAA-geleluert (3.2.4.3.1). Abschließend wurde 1 µg der RNA auf einem PAA-Gel analysiert.

Methoden

Als Positivkontrollen für tRNAs wurden chemisch synthetisierte RNA-Oligonukleotide (Integrated DNA Technologies, Belgien) eingesetzt. Die RNA-Oligonukleotide wurden vor der Gelelektrophorese phosphoryliert (3.2.4.5).

3.2.4.7.4 Herstellung der Sonden

Die Detektion spezifischer RNAs erfolgte mittels intern Digoxigenin-modifizierter Sonden. Diese wurden durch *in vitro* Transkription mit dem DIG RNA Labeling Mix (Roche) hergestellt, welcher Digoxigenin-modifizierte UTPs enthält. Der Transkriptionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden dem Ansatz 2 µl 200 mM EDTA (pH 8) hinzugefügt. Zur Detektion von tRNAs und der vermuteten RNase P RNA aus *A. aeolicus* wurden chemisch synthetisierte Digoxigenin-modifizierte LNA-/DNA-Sonden (Exiqon, Dänemark) verwendet.

In vitro Transkription Digoxigenin-modifizierter Sonden (DIG RNA Labeling Mix)

Reaktionsansatz	Volumen	Endkonzentration
Templat	1 µg	0,05 µg/µl
10x Transkriptionspuffer	2 µl	1x
5x Labeling Mix	4 µl	1x
T7 RNA-Polymerase 10 U/µl	2 µl	1 U/µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	-
Total	20 µl	

3.2.4.7.5 Herstellung der Größenmarker

Als Größenmarker für die Northern Blot-Analyse wurden kleine, laborintern hergestellte RNAs (21 Nt, 49 Nt, 75 Nt, 93 Nt und 190 Nt) verwendet. Dazu wurden jeweils 0,3 – 0,8 µg der einzelnen RNA-Varianten zusammenpipettiert. Die RNA-Größenmarker wurden auf separaten PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt, wobei für die RNA-Größenmarker und die zu blottenden RNAs identische Elektrophorese-Bedingungen verwendet wurden. Im Anschluss an die Elektrophorese der RNA-Größenmarker wurde die Länge und Breite des Gels exakt vermessen. Nach einer Ethidiumbromid-Färbung (3.2.2.4.1) und erneuter Vermessung des gefärbten, leicht gequollenen Gels wurden die Laufweiten und Abstände zwischen den einzelnen Größenmarkern unter UV-Licht bestimmt und dokumentiert. Zur approximativen Größenbestimmung wurden die Membranen der mittels Northern Blot detektierten RNAs wie bei den Größenmarkern beschrieben vermessen und mit den ermittelten Daten der RNA-Größenmarker korreliert.

3.2.4.8 Micrococcal Nuclease-Behandlung mit Träger-RNA

Der Test sollte Aufschluss darüber geben, ob eine RNA-Komponente an der RNase P-Aktivität von *A. aeolicus* beteiligt ist. Die Micrococcal Nuclease (MN) ist eine Endo/Exonuklease, welche sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren schneidet. Das Enzym benötigt für seine Nuklease-Funktion Ca²⁺ als Cofaktor. Durch Zugabe des Komplexbildners Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) kann das Enzym inhibiert werden. EGTA komplexiert zweiwertige Kationen, allerdings ist die Affinität für Ca²⁺-Ionen wesentlich höher als für Mg²⁺-Ionen. Weil die Cofaktoren der MN (Ca²⁺) und der bakteriellen RNase P (Mg²⁺) in unterschiedlichem Ausmaß komplexiert werden, kann im Anschluss an eine Inhibition der MN mittels EGTA das RNA-Substrat der RNase P zu einem

Methoden

Prozessierungs-Ansatz hinzugefügt werden, ohne dass es abgebaut wird. Eine Inhibition der RNase P durch Mg^{2+} -Komplexierung erfolgt bei den eingesetzten EGTA-Konzentrationen nicht.

MN-Inkubationsansatz		Endkonzentration
<i>A. aeolicus</i> RNase P, partiell aufgereinigt	10 μ l	-
MN (300 U/ μ l)	1 μ l	26 u/ μ l
CaCl ₂ 100 mM	0,5 μ l	4,3 mM

Für den Test wurde eine partiell aufgereinigte Probe von *A. aeolicus* eingesetzt. Die Probe war im Vorfeld einer 2 M (NH₄)₂SO₄-Fällung unterzogen worden und der daraus resultierende RNase P-aktive Überstand war anschließend auf einer Octyl Sepharose-Säule aufgereinigt worden. Als Kontrolle wurde *E. coli* RNase P RNA verwendet (Endkonzentration im MN-Inkubationsansatz: 650 nM). In dem Versuchsablauf wurde zunächst die RNase P-aktive Probe von *A. aeolicus* für 30 min in einem Thermomixer bei 37 °C (1000 rpm) mit MN inkubiert. Anschließend wurde die MN durch Zugabe von 2 μ l EGTA (200 mM, pH 8) inhibiert und mit 10 μ l des Ansatzes wurde bei 10 mM Mg^{2+} ein Enzymtest auf RNase P-Aktivität vorgenommen (3.2.6.2). Da die MN auch nach der Inhibition durch Ca²⁺-Komplexierung noch an Substrat binden kann, wurde zum Substrat-Mix zusätzlich Träger-RNA (6S-1 RNA) im 500-fachen Überschuss zur 5'-³²P-markierten Prä-tRNA^{Gly} hinzugefügt, um zu verhindern, dass die MN durch Bindung an die Prä-tRNA diese für eine RNase P-Prozessierung unzugänglich macht. Als Kontrollen wurden ein MN-Inkubationsansatz ohne Ca²⁺ sowie ein Ansatz ohne MN und ohne Ca²⁺ angesetzt.

3.2.4.9 Micrococcal Nuclease Rescue-Experiment

Ziel des Experiments war die Wiederherstellung der RNase P-Aktivität eines rekonstituierten Holoenzym von *A. aeolicus* nach Inkubation mit Micrococcal Nuclease (MN). Als Ausgangsmaterial wurde eine Probe von *A. aeolicus* verwendet, die zuvor mittels DEAE- und Hydrophober Interaktions-Chromatographie aufgereinigt worden war. Die Holoenzym-Komponenten waren nach (3.2.7.3) präpariert worden und das RNase P-aktive Holoenzym wurde nach (3.2.6.5.1) rekonstituiert. Zur Rekonstitution wurden 4,6 μ g Mg(OAc)₂/CH₃COOH-gefällte RNA und 8 μ g Aceton-gefälltes Protein eingesetzt.

Inkubationsansatz	Volumen (Gesamtmenge)
RNA-Mix (siehe 3.2.6.2.1)	10,4 μ l (4,6 μ g Mg(OAc) ₂ /CH ₃ COOH-gefällte RNA)
CaCl ₂ (100 mM)	0,6 μ l (60 nmol)
Präinkubation RNA-Mix: 5 min 55 °C → 40 min 37 °C	Σ 11 μ l
Aceton-gefälltes Protein	4 μ l (8 μ g)
Präinkubation RNA-Protein-Mix: 5 min 37 °C	Σ 15 μ l
MN (300 U/ μ l)	1 μ l (300 U)
MN-Inkubation: 10 min 37 °C	Σ 16 μ l
EGTA (200 mM, pH 8)	2 μ l
„Rescue-RNA“	2 μ l (4,6 μ g Mg(OAc) ₂ /CH ₃ COOH-gefällte RNA)
Inkubation: 10 min 37 °C	Σ 20 μ l

Methoden

Nach der Präinkubation des RNA-Protein-Mixes wurde dieser mit 1 µl MN (300 U/µl) in Gegenwart von Ca^{2+} (3,75 mM) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die MN mit 2 µl EGTA (200 mM, pH 8) inhibiert. Daraufhin wurde zur Wiederherstellung der RNase P-Aktivität 4,6 µg Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA („Rescue-RNA“) hinzugefügt und der Ansatz wurde weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 16 µl des Ansatzes in einem RNase P-Aktivitäts-Assay getestet (3.2.6.2). Parallel dazu wurden Kontrollansätze hergestellt, die ebenfalls auf RNase P-Aktivität getestet wurden: [1] rekonstituiertes *A. aeolicus* Holoenzym, welches mit MN inkubiert wurde, dem aber keine „Rescue-RNA“ hinzugefügt wurde; [2] rekonstituiertes *A. aeolicus* Holoenzym, welches nicht mit MN inkubiert wurde; [3] *B. subtilis* Holoenzym, welches mit MN inkubiert und dem „Rescue-RNA“ (*B. subtilis* RNase P RNA) hinzugefügt wurde; [4] *B. subtilis* Holoenzym, welches mit MN inkubiert wurde, dem aber keine „Rescue-RNA“ hinzugefügt wurde; [5] *B. subtilis* Holoenzym, welches nicht mit MN inkubiert wurde.

3.2.5 Protein-Methoden

Proteinproben wurden langfristig bei -80 °C aufbewahrt, für Versuche auf Eis aufgetaut und anschließend wieder auf -80 °C zurückgestellt. Sie wurden während eines Versuchs durchgehend auf Eis gelagert oder in Eiswasser gekühlt.

3.2.5.1 SDS-Gelelektrophorese

4x Trenngel-Puffer	
1,5 M	Tris/HCl pH 8,8
0,6 %	SDS

4x Sammelgel-Puffer	
0,5 M	Tris/HCl pH 6,8
0,6 %	SDS

4x Protein-Probenpuffer	
4 % (w/v)	SDS
20 % (w/v)	Glycerin
5 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
160 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,04 % (w/v)	Bromphenolblau

5x Laufpuffer für Proteingele	
125 mM	Tris
0,96 M	Glycin
0,5 % (w/v)	SDS

Die Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese wird zur denaturierenden Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Masse angewandt. Es ist eine durch SDS ergänzte denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

In dieser Arbeit wurde das diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoresesystem in Tris-Glycin-Puffern nach Lämmli verwendet (Laemmli 1970), bei dem ein Trenngel von einem Sammelgel überschichtet wird. Die gewählte Polyacrylamid-Konzentration eines SDS-Trenngels richtet sich nach der Masse der zu analysierenden Proteine. 15 %-Gele sind für Proteine mit einer Masse von etwa 10 bis 60 kDa geeignet, 10 %-Gele eignen sich zur Separation von Proteinen mit einer Masse von ca. 30 bis 120 kDa, während 8 %-Gele den Molekulargewichtsbereich zwischen 50 und 200 kDa gut auflösen (Rehm 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend 10 % und 15 % SDS-Gele sowie Stufengradientengele hergestellt (3.2.5.1.1).

Methoden

SDS-Trenngel	15 %	13 %	11 %	10 %	9 %	8 %	7 %
4x Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung)	5 ml	4,33 ml	3,67 ml	3,33 ml	3 ml	2,67 ml	2,33 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
APS (10 %-Lsg.)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
ddH ₂ O	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml	ad 10 ml

Nach dem Mischen der Trenngel-Lösung wurde diese zügig zwischen zwei Glasplatten gegossen, welche in eine Gieß-Vorrichtung eingespannt waren. Beim Gießen des Trenngels wurde darauf geachtet, dass noch ca. 1,5 – 2 cm Platz zum oberen Rand der Glasplatte blieb, damit im Anschluss noch das Sammelgel aufpolymerisiert werden konnte. Direkt nach dem Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten.

SDS-Sammelgel	4 %
4x Sammelgel-Puffer	1,25 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung)	0,67 ml
TEMED	5 µl
APS (10 %-Lsg.)	50 µl
ddH ₂ O	ad 5 ml

Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und die frisch angesetzte Lösung für das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Das Einsetzen eines Teflonkamms zwischen die Glasplatten diente der Bildung von Probestaschen. Das Sammelgel wurde immer in einer Konzentration von 4 % Polyacrylamid angefertigt.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 4x Protein-Probenpuffer gemischt (Verhältnis Probenvolumen : Puffervolumen = 3 : 1). Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Proteingel für 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese kurz zentrifugiert. Nachdem das Sammelgel nach etwa 30 min auspolymerisiert war, wurde der Kamm herausgezogen und das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt („Mini PROTEAN® 3 cell“, Bio-RAD). Die Kammer wurde mit 1x Laufpuffer für Proteingele (5x Laufpuffer 1 : 5 mit demin. H₂O verdünnt) befüllt. Anschließend wurde das Gel mit den Proben beladen und parallel dazu wurde ein Protein-Größenmarker (PAGE-Ruler Prestained Plus Protein Ladder, Thermo Scientific) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 – 160 V.

3.2.5.1.1 SDS-Stufengradientengel

Für Stufengradientengele wurde zunächst die Höhe der beiden Glasplatten gemessen, zwischen die das Gel gegossen werden sollte. Von der Höhe wurde ein Wert abgezogen, der der Höhe eines Sammelgels entspricht (in der vorliegenden Arbeit betrug die Höhe des Sammelgels ca. 1,5 cm inklusive Geltaschen). Die Differenz wurde durch die Anzahl der geplanten Gelstufen dividiert, so dass sich die Höhe der einzelnen Stufen ergab. Die Höhe jeder Stufe betrug ca. 9 mm für ein sechs-stufiges Gradientengel in der vorliegenden Arbeit. Die Soll-Höhe der Gelstufen wurde mit einem Stift auf den Glasplatten markiert.

Methoden

Anschließend wurden sukzessive die Gellösungen verschiedener Konzentrationen angesetzt. Angefangen mit der Lösung der höchsten Konzentration (15 %) wurden die Gellösungen bis zur jeweils nächst-höheren Markierung auf der Glasplatte gegossen. Dabei wurde die folgende Stufe erst gegossen, wenn die vorangegangene auspolymerisiert war. Den Abschluss bildete ein Sammelgel (4 %). Die Elektrophorese erfolgte analog der eines Standard-Proteingels.

3.2.5.2 Proteingel-Färbung

3.2.5.2.1 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Kolloidale Coomassie Färbelösung

5 % (w/v)	Al ₂ (SO ₄) ₃ 16-Hydrat
10 % (v/v)	EtOH 99 %
0,05 % (w/v)	CBB G250
2 %	o-Phosphorsäure
demin. H ₂ O ad 1 Liter	

Entfärber für kolloidale Coomassie-Färbung	Endkonzentration
50 ml EtOH 99 %	10 % (v/v)
12 ml o-Phosphorsäure (85 %)	2 %
demin. H ₂ O ad 0,5 Liter	

Der hohen Sensitivität wegen wurden Protein-Gele im Laufe dieser Arbeit hauptsächlich mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Färbemethode war, dass Gele, welche auf diese Weise angefärbt werden, nicht die massenspektrometrische Analyse stören. Das Protokoll ist eine modifizierte Färbemethode, die auf zwei Publikationen ((Kang *et al.* 2002), (Candiano *et al.* 2004)) basiert und modifiziert wurde (Dyballa 2008).

Bei der Herstellung der Färbelösung ist aufgrund der Löslichkeit der Komponenten die Reihenfolge zu beachten, in der die Zutaten hinzugegeben werden. Für 1 L Färbelösung werden zuerst 50 g Al₂(SO₄)₃ in 750 ml demin. H₂O gelöst, dann werden 100 ml Ethanol (99 %) hinzugefügt und der Ansatz wird gemischt. Anschließend werden 0,5 g Coomassie Brilliant Blau (CBB) G250 hinzugefügt und die Mischung wird gründlich gerührt. Nach der Zugabe von 24 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) wird der Ansatz nochmals gründlich gerührt und schließlich mit demin. H₂O auf 1 L aufgefüllt. Die kolloidalen Partikel dürfen nicht abfiltriert werden. Die Färbelösung sollte dunkel gelagert werden, damit sie etwa 10 – 12 Monate haltbar ist.

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 2 x 10 min in demin. H₂O geschwenkt. Die Färbelösung mit dem kolloidalen Coomassie wurde vor Gebrauch aufgeschüttelt und das Gel wurde, mit einem lichtundurchlässigen Deckel bedeckt, über Nacht in der Lösung geschwenkt. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung abgegossen und das Gel 2 x 5 min in demin. H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Gel 30 – 45 min mit einem lichtundurchlässigen Deckel bedeckt im Entfärber geschwenkt. Vor der Dokumentation mit einem Gel-Scanner (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-RAD) wurde das Gel abermals 2 x 5 min in demin. H₂O gewaschen.

Methoden

3.2.5.2.2 Massenspektrometrie-kompatible Silberfärbung

<u>Fixierlösung</u>	<u>Vorfärbelösung</u>
25 ml Methanol	250 µl Na ₂ S ₂ O ₃ (40 mg/ml)
6 ml Essigsäure konz. (100 %)	ddH ₂ O ad 50 ml
27 µl Formaldehyd (37 %)	
ddH ₂ O ad 50 ml	
<u>Silbernitratlösung (2 mg/ml)</u>	<u>Entwicklerlösung</u>
100 mg Silbernitrat	3 g Na ₂ CO ₃
94 µl Formaldehyd (37 %)	94 µl Formaldehyd (37 %)
ddH ₂ O ad 50 ml	150 µl Na ₂ S ₂ O ₃ (40 mg/ml)
	ddH ₂ O ad 50 ml
<u>Stopp-Lösung</u>	<u>Lagerpuffer</u>
25 ml Methanol	10 % (v/v) Glycerin
6 ml Essigsäure konz. (100 %)	5 % (v/v) Ethanol
ddH ₂ O ad 50 ml	

Das Protokoll (von der Abteilung Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt) beschreibt eine Silberfärbung von Proteinen im Gel, die sehr sensitiv ist und gleichzeitig nicht die massenspektrometrische Analyse von Proteinen stört. Die angegebenen Puffer und Lösungen sind kurz vor Gebrauch frisch anzusetzen.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde wie folgt mit dem Protein-Gel verfahren:

Das Gel wurde für 1 h in Fixierlösung fixiert und anschließend 3 x 20 min in 50 % (v/v) Ethanol p.a. gewaschen. Es folgte die Vorfärbung für 30 min in Vorfärbelösung. Anschließend wurde das Gel 3 x 20 s mit ddH₂O gewaschen, bevor die eigentliche Silberfärbung vorgenommen wurde: Dazu wurde das Gel für 30 min in Silbernitratlösung (2 mg/ml) eingelegt, gefolgt von dreimaligem Waschen (3 x 20 s) in ddH₂O. Abschließend wurde das Gel etwa 4 – 6 min in Entwicklerlösung geschwenkt, bis alle Signale sichtbar waren, aber der Hintergrund noch nicht gefärbt war. Die Entwicklung wurde durch das Überführen des Gels in Stopp-Lösung beendet. Zur Lagerung wurde das Gel in Lagerpuffer aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Gel-Scanner (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-RAD).

3.2.5.3 Probenvorbereitung für massenspektrometrische Analyse

3.2.5.3.1 Vorbereitung von Gelstücken

Zur Identifizierung von Proteinen aus denaturierenden SDS-Gelen wurden die zu analysierenden Gelbanden nach der Färbung (mit kolloidalem Coomassie (3.2.5.2.1) oder Massenspektrometrie-kompatibler Silberfärbung (3.2.5.2.2)) mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Ausschneiden geschah auf einer mit Ethanol abs. gesäuberten Glasplatte. Die gefärbten Gelbanden wurden möglichst eng begrenzt ohne proteinfreie

Methoden

Gelbereiche ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden bis zur Analyse in separaten Eppendorfgefäßen (1,5 ml) bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.5.3.2 Vorbereitung von Flüssigproben

Für die Analyse von Flüssigproben bedurfte es keiner weiteren Vorbereitung. Es wurden je 25 µl Probe in Puffer A10 bzw. Puffer A260 abgegeben. Die Flüssigproben wurden bis zur Analyse in Eppendorfgefäßen (1,5 ml) bei -20 °C oder bei -80 °C gelagert.

3.2.5.4 Dialyse

Zur Dialyse wurden die jeweiligen Dialyse-Puffer vorgekühlt (4 °C). Dialyseschläuche (ZelluTrans, MWCO 12 - 14 kDa, Roth) wurden vorab in der benötigten Größe zurechtgeschnitten und in ddH₂O aufgekocht. Die Schläuche wurden in dem Wasser belassen, bis sie befüllt wurden. Nach dem Einfüllen der Proben und Verschließen der Dialyseschläuche wurden letztere in ein Becherglas mit Dialysepuffer (10 - 15-faches Probenvolumen) überführt. Ein mit Ethanol abs. gesäuberter Rührfisch wurde hinzugefügt, das Becherglas mit Aluminiumfolie abgedeckt und die Dialyse bei 4 °C ü.N. unter leichtem Rühren auf einem Magnetrührer durchgeführt. Der Dialysepuffer wurde im Laufe einer Dialyse 2 x gewechselt und durch frischen Puffer ersetzt. Der erste Pufferwechsel erfolgte nach 1 - 2 h, der zweite Pufferwechsel erfolgte nach 2 - 3 h. Im Anschluss an die Dialyse wurden die Proben - wenn nicht anders angegeben - zur weiteren Verarbeitung in sterile Falcon Tubes (15 ml oder 50 ml) überführt oder zur Ankonzentrierung direkt in passende Zentrifugations-Filtereinheiten (Amicon® Ultra, Millipore) überführt.

3.2.5.4.1 Mini-Dialyse

Für die Mini-Dialyse wurde eine Kanüle in der Flamme eines Bunsenbrenners erhitzt und damit ein Loch (Durchmesser ca 0,4 cm) in den Deckel eines sterilen Eppendorf-Gefäßes (1,5 ml) geschmolzen. Je nach Probenanzahl wurden entsprechend viele Eppendorf-Gefäße in Dialyse-Gefäße umgearbeitet. Die vorbereiteten Dialyse-Gefäße wurden nochmals autoklaviert. Zur Vorbereitung der Dialyse wurde ein Stück Dialyseschlauch in ddH₂O aufgekocht (siehe 3.2.5.4) und aufgeschnitten, so dass eine Membran aus nur einer Lage entstand. Dann wurde die Probe (500 µl) in das Dialysegefäß überführt. Ein Stück Dialysemembran wurde abgeschnitten (1,5 x 1,5 cm) und auf die Öffnung des offenen Dialyse-Gefäßes gelegt, in welchem sich die Probe befand. Das Dialyse-Gefäß mit dem präparierten Deckel wurde fest verschlossen, so dass sich die Membran zwischen dem Proben-Reservoir und dem Deckel des Gefäßes befand und fest zwischen diesen eingeklemmt war. Das Mini-Dialyse-Gefäß wurde über Kopf mit dem Deckel nach unten in Schaumstoff-Schwimmer mit ausgestanzten Löchern gesteckt. Bevor der Schwimmer in ein Becherglas mit vorgekühltem Dialyse-Puffer gegeben wurde, wurde das Eppendorf-Gefäß oben am konischen Ende mit dem Finger angeschnippst, damit die darin enthaltene Probe nach unten floss, um möglichst vollständigen Kontakt zur Dialysemembran zu haben. Luft zwischen dem Deckel des Dialysegefäßes und der Membran wurde entfernt, indem Dialysepuffer von unten durch das ausgeschmolzene Loch in den Hohlraum pipettiert wurde, bis dieser vollständig mit Puffer gefüllt war und überschüssiger Puffer als Tropfen unten am Deckel hing. Der Schaumstoffschwimmer wurde vorsichtig - ohne Luftblasen zwischen dem Gefäßdeckel und der Membran einzuschließen - in das Becherglas mit dem Dialysepuffer auf die Pufferoberfläche gesetzt, so dass die Dialyse-Gefäße mit dem konischen Ende aus

Methoden

dem Schwimmer nach oben ragten und die präparierten Deckel mit der Membran Kontakt zum Puffer hatten.

Der weitere Verlauf entspricht dem einer Standard-Dialyse (s. oben), mit der Abweichung, dass der Dialyse-Puffer nur einmal gewechselt wurde.

3.2.5.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewandt (Bradford 1976).

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde eine Standardreihe mit 7 BSA-Konzentrationen hergestellt. Nach dem Zusammenfügen von demin. Wasser, BSA und dem Bradford-Reagenz wurden die Ansätze gevortext und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Inkubationszeit wurde genau eingehalten, da es sich um eine zeitabhängige Farbreaktion handelt.

		Standard						
	Leerwert	Nr.1	Nr.2	Nr.3	Nr.4	Nr.5	Nr.6	Nr.7
demin. H ₂ O	800 µl	790 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl	700 µl	600 µl
BSA (100 µg/ml)	-	10 µl	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	100 µl	200 µl
Bradford-Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Inkubation	5 min							
Total	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Proteingehalt abs.	-	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg	10 µg	20 µg

Nach Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Proben vermessen. Das Pipettierschema war analog dem Schema für die Standardreihe, wobei das BSA durch die zu messende Probe ersetzt wurde. Je nach eingesetztem Probenvolumen wurde das Volumen von demin. H₂O angepasst (ad 1 ml). Aus den Absorptionswerten für die Standardreihe (y-Werte) und dem bekannten Proteingehalt (x-Werte) wurde mit Microsoft Excel durch lineare Regression die Steigung (m) und der Achsenabschnitt (b) ermittelt. Die gemessenen A₅₉₅-Werte der Proben wurden als y-Werte in die Formel $y = m \times x + b$ eingesetzt und so ihr Proteingehalt quantifiziert. Unter Einbeziehung des eingesetzten Probenvolumens wurde die Proteinkonzentration der gemessenen Proben berechnet.

3.2.5.6 Ankonzentrierung

Die Ankonzentrierung von Proben im Rahmen des Aufreinigungsprozesses erfolgte mit Zentrifugations-Filtereinheiten (Millipore) bei 4 °C entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die präparative Ankonzentrierung von Probenvolumina nach der Anionenaustausch-Chromatographie (3.2.7.2.1) und Hydrophoben Interaktions-Chromatographie (3.2.7.2.2) wurden Zentrifugations-Filtereinheiten verwendet, die für Probenvolumina von 4 - 15 ml geeignet sind. Zur Reduktion des Probenvolumens für die Gelchromatographie (3.2.7.2.3) und für das Ankonzentrieren der eluierten Gelchromatographie-Fraktionen wurden Konzentratoren für Probenvolumina ≤ 2 ml verwendet. Die Ankonzentrierung erfolgte überwiegend in einem Ausschwingrotor bei 3200 x g. Wenn nicht anders angegeben, wurden Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa eingesetzt.

3.2.5.7 Präparation von Proteinen

3.2.5.7.1 PRORP1-Präparation

PRORP1 ist die pflanzliche mitochondriale RNase P aus *Arabidopsis thaliana*. PRORP1 wurde durch rekombinante Expression und Aufreinigung, wie in Pavlova *et al.* (2012) beschrieben, präpariert. Als Expressionsvektor wurde pET-28b(+) verwendet, in welchen das PRORP1-kodierende Gen über die Restriktionsschnittstellen *Nco* I und *Xho* I kloniert war. Die Aufreinigung erfolgte über einen C-terminalen *His*₆-tag mit Ni-NTA Affinitätschromatographie.

3.2.5.7.2 Präparation des RNase P Proteins von *B. subtilis*

Lysozym-Stammlösung: 10 mg/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)-Stammlösung: 20 mg/ml in Isopropanol

Sonifizierungs-Puffer		Wasch-Puffer	
50 mM	Tris/HCl pH 8,0	50 mM	Tris/HCl pH 8,0
0,3 M	NaCl	30 mM	Imidazol
0,1 %	Triton X-100	8 M	Harnstoff
1 M	NH ₄ Cl	0,1 %	Triton X-100

Elutionspuffer		Dialyse-Puffer	
50 mM	Tris/HCl pH 7,0	50 mM	Tris/HCl pH 7,0
300 mM	Imidazol	0,1 M	NaCl
10 % (v/v)	Glycerin	10 % (v/v)	Glycerin
7 M	Harnstoff		
20 mM	EDTA		

Das RNase P Protein von *B. subtilis* (kodiert auf Plasmid pQE-30 in *E. coli* JM109), das einen N-terminalen *His*-tag trägt (N-terminale Peptidverlängerung: MRGSHHHHHHGS), wurde wie beschrieben präpariert (Rivera-Leon *et al.* 1995). Entsprechende Flüssigkulturen von *E. coli* JM109 pQE-30 (in LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) wurden bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 auf 1 mM IPTG eingestellt. Als nach ca. 3 h Wachstum eine OD₆₀₀ von 2,5 erreicht worden war, wurden die Zellen abzentrifugiert (4 °C, 5000 rpm, 10 min). Alle darauffolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt und alle Puffer mit PMSF (Endkonzentration 40 µg/ml) versehen. Zunächst wurden die Zellen in 1 bis 5 ml Sonifizierungs-Puffer resuspendiert (2 ml Sonifizierungs-Puffer / 0,1 g Zellpellet). Dann wurden Lysozym (Endkonzentration 300 mg/ml) und PMSF hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und im Anschluss daran der Zellaufschluss mittels Sonifizierung für 15 min (Branson Sonifier 250, „Output control“: 2 – 4, Zyklus: 50 %) in einem Eiswasserbad. Dann wurde DNase I (1 µl pro 2 ml Zellsuspension) hinzugefügt und der Zellaufschluss vorsichtig invertiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und zwischenzeitlichem vorsichtigem Invertieren wurde der Aufschluss für 30 min bei 14500 x g zentrifugiert (4 °C). Der Überstand wurde mit Ni-NTA Agarose (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) gemischt (400 µl Ni-

Methoden

NTA Agarose für 2 L Zellkultur), welche zuvor durch zweimaliges Waschen in 10 ml Sonifizierungs-Puffer vorbehandelt worden war. Nach 1 - 2 h Rotation bei 4 °C wurde die Ni-NTA Agarose in Eppendorfgefäße überführt und durch wiederholte Zentrifugations-Resuspensionszyklen (2 min, 4 °C, 8500 rpm in einer Tischzentrifuge) 3 x mit eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Dabei wurde der Überstand nach jedem Zentrifugationsschritt sehr vorsichtig abgenommen, da das RNase P Protein bei diesem Schritt bereits auszufallen beginnt. Nach Zugabe von 500 µl Elutionspuffer zur Ni-NTA Agarose erfolgte die Elution unter leichtem Schütteln bei 4 °C für 45 min. Nach der Elution wurde die Ni-NTA Agarose abzentrifugiert (2 min, 4 °C, 8500 rpm) und der Überstand wurde in einen Dialyse-Schlauch überführt (Ausschlussgröße 12 bis 14 kDa). Nach 2 x 60 min Dialyse bei 4 °C gegen je 500 ml Dialyse-Puffer erfolgte ein dritter Dialyse-Schritt über Nacht (500 ml Dialyse-Puffer, 4 °C). Während der Dialyse bildete sich ein weisses Präzipitat. Am nächsten Tag wurde der Inhalt des Dialyseschlauchs in Eppendorfgefäße (2 ml) überführt und 20 min bei 12000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Im Überstand befand sich das Protein ohne P RNA-Kontamination. Das Pellet, das Spuren von RNA enthielt, wurde verworfen. Alle Schritte wurden mittels SDS-PAGE (17 %) überprüft, um die Reinheit und Ausbeute des P Proteins zu überprüfen.

3.2.6 RNA-Protein-Methoden

3.2.6.1 Präparation von *B. subtilis* RNase P Holoenzym

KN-Puffer

20 mM	HEPES/KOH pH 7,4
150 mM	NH ₄ OAc
2 mM	Spermidin
0,05 mM	Spermin
4 mM	β-Mercaptoethanol

Das RNase P Holoenzym von *B. subtilis* wurde in dieser Arbeit hauptsächlich als Positiv-Kontrolle und zur Verifizierung der Schnittstelle der RNase P-Prozessierungsreaktion eingesetzt. Für die Präparation der *B. subtilis* RNase P wurde das P Protein (kodiert auf Plasmid pPWT1 in *E. coli* BL21(DE3)pLysS (William Studier *et al.* 1990), (Studier 1991)) nach Niranjankumari *et al.* (1998a) exprimiert und aufgereinigt, mit der Abweichung, dass die Zellen mit einem Zell-Homogenisierer (MPI FastPrep 24) aufgeschlossen wurden. Der Zellaufschluss wurde nach Herstellerangaben mit autoklavierten Glasperlen (1,25 - 1,55 mm, Roth) durchgeführt. Als Programm wurde das Basisprogramm gewählt (4,0 M/S; 20 s).

Die *B. subtilis* P RNA wurde mittels *in vitro* Transkription hergestellt. Als Templat diente *Dra* I-linearisiertes Plasmid pDW66 (Smith *et al.* 1992). Zur Rekonstitution des Holoenzym aus Protein- und RNA-Untereinheit wurden 16 pmol *B. subtilis* P RNA in 1496 µl 1x KN-Puffer 1 min bei 85 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und der Metallblock, in dem sich der Reaktionsansatz befand, aus dem Heizblock genommen. Mit Hilfe eines Thermometers wurde die Temperaturentwicklung beobachtet, bis der Metallblock nach etwa 1,5 h auf Raumtemperatur abgekühlt war. Anschließend wurde Magnesiumacetat zur P RNA-Lösung gegeben (4,5 mM bezogen auf den finalen Holoenzym-Ansatz) und 5 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 64 pmol P Protein, das bereits in 32 µl 1x KN-Puffer vorlag. Dann wurde der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert, auf Eis gestellt und in

Methoden

16 µl-Aliquots portioniert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Endkonzentration der Komponenten betrug 40 nM *B. subtilis* P Protein und 10 nM *B. subtilis* P RNA in 1x KN-Puffer mit 4,5 mM Mg(OAc)₂.

3.2.6.2 Enzymtest auf RNase P-Aktivität

5x Puffer A0		5x KN-Puffer	
250 mM	Tris/HCl pH 7,45	100 mM	HEPES/KOH pH 7,4
300 mM	NH ₄ Cl	750 mM	NH ₄ OAc
30 mM	DTT	10 mM	Spermidin
		0,25 mM	Spermin
		20 mM	β-Mercaptoethanol

2x RNA-Probenpuffer	
0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
0,02 % (w/v)	Xylencyanolblau
2,6 M	Harnstoff
66 % (v/v)	Formamid
in 2x TBE Puffer pH 8,0	

Zum Nachweis von RNase P-Aktivität in partiell aufgereinigten Fraktionen von *A. aeolicus* wurde als Substrat vorwiegend 5'-³²P-endmarkierte Prä-tRNA^{Gly} (93 Nt) aus *Thermus thermophilus* eingesetzt. Durch RNase P-Aktivität wurde von dieser Prä-tRNA eine 14 Nukleotide lange 5'-Flanke endonukleolytisch abgespalten. Zur Verifizierung der Spaltstelle wurden parallel Reaktionen mit *E. coli* RNase P RNA, *B. subtilis* RNase P Holoenzym oder *A. thaliana* PRORP1 als Positivkontrolle durchgeführt. Die Auftrennung von nicht-prozessierter Prä-tRNA und abgespaltener 5'-Flanke erfolgte auf einem denaturierenden PAA-Gel (20 %) bei 12 – 35 mA (3.2.2.3.2). Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau 2/3 der Laufstrecke (von der Geltasche bis zur Gelkante) gelaufen war. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie (3.2.2.4.3).

Die Enzymtests wurden in 20 µl-Ansätzen mit 1x Reaktionspuffer A0 (für partiell aufgereinigte *A. aeolicus*-Fraktionen und *E. coli* P RNA) oder 1x Reaktionspuffer KN (für *B. subtilis* RNase P Holoenzym, PRORP1) bei 37°C durchgeführt. Bei Aktivitätstests mit *A. aeolicus*-Fraktionen, RNase P Holoenzym und PRORP1 wurde eine Endkonzentration von 4,5 mM Mg²⁺ eingestellt, wenn nicht anders angegeben. *E. coli* P RNA-Reaktionen (zur Verifizierung der Schnittstelle) wurden bei 10 mM Mg²⁺ durchgeführt. Die Einstellung der erforderlichen Magnesiumkonzentrationen erfolgte mit einer 100 mM Mg(OAc)₂-Stammlösung. Die einzelnen Reaktionskomponenten wurden separat in einem Enzym-Mix (RNase P-Enzym in 1x Reaktionspuffer mit Mg²⁺) und einem Substrat-Mix (Substrat in 1x Reaktionspuffer mit Mg²⁺) vorbereitet und präinkubiert (s.u.). Der Reaktionsstart zur Initiation der Prozessierungsreaktion erfolgte durch Mischen von 4 µl Substrat-Mix und 16 µl Enzym-Mix. Für die Negativkontrolle wurde der Substrat-Mix zu 16 µl 1x Reaktionspuffer mit Mg²⁺ hinzugefügt. Die Inkubation des Spaltansatzes erfolgte bei 37 °C für 15 – 60 min. Die Prozessierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. 2x RNA-Probenpuffer und kurzem Mischen gestoppt.

Methoden

3.2.6.2.1 Enzym-Mix: Zusammensetzung und Präinkubation

Zusammensetzung Enzym-Mix

Komponente	<i>A. aeolicus</i> -Fraktion	<i>B. subtilis</i> / PRORP1	<i>E. coli</i> P RNA
RNase P	1 - 10 µl *	4 - 8 nM / 1,4 µM	280 nM
5x Puffer	1x A0 Puffer	1x KN Puffer	1x A0 Puffer
Mg (OAc) ₂	4,5 mM Mg (OAc) ₂ **	4,5 mM Mg (OAc) ₂	10 mM Mg (OAc) ₂
ddH ₂ O	ad. 20 µl	ad. 20 µl	ad. 20 µl

* Das Volumen ist abhängig vom Aufreinigungsschritt, aus dem die Fraktion stammt. Das jeweils eingesetzte Volumen ist im Kontext der einzelnen Reinigungsmethoden spezifiziert.

** wenn nicht anders angegeben

Die Enzymtests auf RNase P-Aktivität wurden mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, die sich in den Präinkubationsschritten unterscheiden.

Bei Methode 1 wurde nur ein Präinkubationsschritt mit dem zu testenden RNase P-Enzym durchgeführt. Dabei wurde das Enzym mit dem entsprechenden Reaktionspuffer und Mg²⁺ zu einem Enzym-Mix vereinigt und unmittelbar vor Reaktionsstart 5 min bei 37 °C inkubiert. Diese Methode fand ihre Anwendung beim Nachweis von RNase P-Aktivität in partiell aufgereinigten Fraktionen aus *A. aeolicus* sowie bei Positivkontrollen zur Verifizierung der Schnittstelle mit *E. coli* P RNA, PRORP1 oder *B. subtilis* RNase P (rekonstituiertes Holoenzym, 3.2.6.1). Auch bei Protein-allein Reaktionen zur Kontrolle in *A. aeolicus* Holoenzym-Rekonstitutionsexperimenten wurde die Protein-Komponente im Reaktionspuffer mit Mg²⁺ auf diese Weise präinkubiert.

Bei Methode 2 wurden vor dem Reaktionsstart zwei aufeinanderfolgende Präinkubationsschritte mit dem RNA-Mix durchgeführt. Der RNA-Mix, bestehend aus der katalytischen RNA-Komponente und dem entsprechenden Reaktionspuffer, wurde vor Reaktionsbeginn zunächst 5 min bei 55 °C und anschließend 40 – 50 min bei 37 °C präinkubiert. Diese Methode wurde verwendet, wenn die RNase P-Aktivität von RNA-Komponenten in RNA-allein Reaktionen untersucht wurde, oder für die Präinkubation des RNA-Mixes bei der Rekonstitution bakterieller RNase P-Holoenzyme. In letzterem Fall wurde anschließend die Proteinkomponente hinzugefügt und der Ansatz weitere 5 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.6.2.2 Substrat-Mix: Zusammensetzung und Präinkubation

Zusammensetzung Substrat-Mix

Komponente	<i>A. aeolicus</i> -Fraktion, Negativ-Kontrolle	<i>B. subtilis</i> RNase P, PRORP1	<i>E. coli</i> P RNA
5'- ³² P-Prä-tRNA ^{Gly}	600 - 750 Cherenkov cpm / µl*	600 - 750 Cherenkov cpm / µl*	600 - 750 Cherenkov cpm / µl*
5x Puffer	1x A0 Puffer	1x KN Puffer	1x A0 Puffer
Mg(OAc) ₂	4,5 mM Mg(OAc) ₂	4,5 mM Mg(OAc) ₂	10 mM Mg(OAc) ₂
ddH ₂ O	ad 10 µl	ad 10 µl	ad 10 µl

* Es wurden immer geringste Mengen radioaktiv markierter Prä-tRNA^{Gly} eingesetzt, so dass die Endkonzentration im Prozessierungsansatz < 1 nM war.

Der Substrat-Mix wurde 5 min bei 55 °C und anschließend 25 min bei 37 °C präinkubiert.

3.2.6.3 Kinetische Untersuchung der *A. aeolicus* RNase P-Aktivität

In RNase P-Aktivitätstests sollte der Reaktionsverlauf für partiell aufgereinigte RNase P-aktive Fraktionen aus *A. aeolicus* untersucht werden. Die Durchführung erfolgte zunächst wie im Kapitel „Enzymtest auf RNase P-Aktivität“ (3.2.6.2) beschrieben. Nach dem Reaktionsstart durch Zugabe von 4 µl Substrat-Mix zu 16 µl Enzym-Mix wurde zu definierten Zeitpunkten je ein 4 µl-Aliquot entnommen (= „Zeitwert“). Nach Entnahme eines Zeitwerts aus einem Prozessierungsansatz wurde die Reaktion durch sofortige Zugabe von 1 Vol. 2x RNA-Probenpuffer gestoppt. Ein Aliquot des Substrat-Mixes diente als Negativ-Kontrolle (= „Null-Wert“) und wurde ohne weitere Zugabe von Enzym oder RNA für die Dauer des Messzeitraums parallel inkubiert und dann ebenfalls mit 1 Vol. 2x RNA-Probenpuffer gemischt. Alle Zeitwerte wurden in der Reihenfolge ihrer Entnahme aus dem Spaltansatz auf ein denaturierendes PAA-Gel (20 %) aufgetragen und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach der autoradiographischen Detektion konnte der Reaktionsverlauf der Prozessierungsreaktion quantifiziert werden.

3.2.6.4 Prozessierung der *E. coli* Prä-tRNA^{His}

Die Prä-tRNA^{His}-Prozessierung durch *A. aeolicus* RNase P sollte hinsichtlich der Position der Spaltstelle mit bakterieller RNase P (*B. subtilis* RNase P Holoenzym) und Protein-basierter RNase P (*A. thaliana* PRORP1) verglichen werden. Für den Enzymtest (3.2.6.2) wurden 2,5 µl einer partiell aufgereinigten Fraktion aus *A. aeolicus* verwendet, die im Vorfeld mittels DEAE-, HIC- und Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt worden war. Die Durchführung der RNase P-Enzymtests erfolgte wie beschrieben (3.2.6.2) in Puffer A0 (*A. aeolicus*-Fraktion) bzw. in KN-Puffer (*B. subtilis* RNase P Holoenzym, *A. thaliana* PRORP1) bei jeweils 4,5 mM Mg²⁺. Die Endkonzentration von PRORP1 im Spaltansatz war 1,1 µM, die des *B. subtilis* Holoenzym 4,8 nM. Als Substrat wurde 5'-³²P-markierte Prä-tRNA^{His} von *E. coli* verwendet, die wie die Prä-tRNA^{Gly} von *T. thermophilus* in einem Substrat-Mix angesetzt und präinkubiert wurde (3.2.6.2.2). Die Inkubationszeit von Substrat mit Enzym betrug 20 min. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze nach dem Enzymtest erfolgte auf 20 % und 25 % denaturierenden PAA-Gelen.

3.2.6.5 *Aquifex aeolicus* RNase P-Holoenzymrekonstitution

3.2.6.5.1 Vorversuch

Bevor die Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA (3.2.7.3) einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen wurde, wurde ein Vorversuch durchgeführt: In einem Holoenzym-Rekonstitutionsexperiment (für Details, siehe 3.2.6.5.2) wurde Mg(OAc)₂-/CH₃COOH-gefällte RNA mit Aceton-gefälltem Protein (3.2.7.3) vereinigt und dieser Ansatz auf RNase P-Aktivität getestet. Zusätzlich wurden die Aceton-gefällte Proteinpräparation und die Mg(OAc)₂-/CH₃COOH-gefällte RNA-Präparation separat auf RNase P-Aktivität getestet. In den Aktivitätstests der Vorversuche lagen die RNA- und Protein-Komponenten aus *Aquifex aeolicus* in folgenden Konzentrationen vor:

Komponente	Endkonzentration im Spaltansatz	
	im Rekonstitutions-Ansatz	in der Allein-Reaktion
Mg(OAc) ₂ -/ CH ₃ COOH-gefällte RNA	0,09 – 0,1 µg/µl	0,09 – 0,1 µg/µl
Aceton-gefälltes Protein	0,2 – 0,3 µg/µl	0,28 – 0,3 µg/µl

3.2.6.5.2 RNase P-Holoenzymrekonstitution

5x Puffer A0		5x KN-Puffer	
250 mM	Tris/HCl pH 7,45	100 mM	HEPES/KOH pH 7,4
300 mM	NH ₄ Cl	750 mM	NH ₄ OAc
30 mM	DTT	10 mM	Spermidin
		0,25 mM	Spermin
		20 mM	β-Mercaptoethanol

Puffer A10: entspricht 1x Puffer A0 mit zusätzlich 10 mM Mg(OAc)₂

KN-Puffer 4,5: entspricht 1x KN-Puffer mit 4,5 mM Mg(OAc)₂

Konnte durch Kombination der RNA- und der Protein-Präparation im Vorversuch RNase P-Aktivität nachgewiesen werden, so wurde die Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA mit Phenol/Chloroform extrahiert (3.2.2.1) und anschließend mit Ethanol gefällt (3.2.2.2.1). Durch die zusätzliche Phenol/Chloroform-Extraktion sollten eventuell vorhandene restliche Proteinbestandteile vollständig aus der RNA-Präparation entfernt werden. Das RNA-Pellet wurde zusätzlich mit Ethanol (70 %) gewaschen und nach Lufttrocknung in Puffer A10 gelöst. Die auf diese Weise vorbehandelte RNA-Präparation wurde nun im Holoenzym-Rekonstitutionsexperiment mit dem Aceton-gefällten Protein zusammengegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend durch Inkubation mit radioaktiv markierter Prä-tRNA^{Gly} auf RNase P-Aktivität getestet. Als Kontrollen wurden das Aceton-gefällte Protein und die gefällte, phenolisierte RNA jeweils alleine in separaten Reaktionsansätzen auf RNase P-Aktivität getestet. Die Durchführung des Experiments entspricht dem Enzymtest auf RNase P-Aktivität (3.2.6.2). Die Aceton-gefällte Protein-Fraktion wurde dabei für die Allein-Reaktion nach Methode 1 präinkubiert und der RNA-Mix der RNA-allein Reaktion nach der Methode 2. Im Einzelnen verlief das Rekonstitutions-Experiment folgendermaßen: Die phenolisierte RNA wurde mit 5x Puffer A0, einer Mg(OAc)₂-Stammlösung und ddH₂O zu einem RNA-Mix zusammenpipettiert, welcher 5 min bei 55 °C und daraufhin 40 min bei 37 °C präinkubiert wurde. Es folgte die Zugabe der Aceton-gefällten Proteine und eine weitere Präinkubation des RNA-Protein-Mixes für 5 min bei 37 °C. Parallel dazu wurde ein Substrat-Mix mit 5'-³²P-markierter Prä-tRNA^{Gly}, 5x Puffer A0, Mg(OAc)₂-Stammlösung und ddH₂O zusammenpipettiert. Der Substrat-Mix wurde dann für 5 min bei 55 °C und für 25 min bei 37 °C präinkubiert. Zur Initiation der Spaltreaktion wurde je 16 µl präinkubierter RNA-Protein-Mix mit je 4 µl präinkubiertem Substrat-Mix gemischt. Die Volumina von 5x Puffer und Mg(OAc)₂-Stammlösung wurden jeweils so berechnet, dass die Mg²⁺-Endkonzentration im Reaktionsansatz 4,5 mM und der Puffer A0 als 1x Puffer vorlag. Die Endkonzentration der Aceton-gefällten Proteine im Spaltungsansatz betrug 0,04 – 0,3 µg/µl und die Endkonzentration der Mg(OAc)₂-CH₃COOH-gefällten, phenolisierten RNAs 0,02 – 0,1 µg/µl. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit *B. subtilis* Holoenzym eingesetzt (3.2.6.2) und als Negativ-Kontrolle ein Aliquot des Substrat-Mixes ohne weitere Zugabe von Proteinen oder RNA. Zusätzlich wurde ein RNA-allein Reaktionsansatz mit RNase P RNA von *B. subtilis* und Substrat inkubiert (3.2.6.2). Die Prozessierungsreaktionen mit *B. subtilis* P RNA und *B. subtilis* Holoenzym wurden in KN-Puffer mit 4,5 mM Mg(OAc)₂ durchgeführt. Die

Methoden

Konzentration des *B. subtilis* Holoenzym im Spaltansatz war 5 - 6,4 nM. Die *B. subtilis* P RNA lag in der RNA-allein Reaktion in Konzentrationen zwischen 8 - 25 nM vor. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. 2x RNA-Probenpuffer zum 20 µl-Prozessierungsansatz. Die Inkubationszeit betrug 15 - 60 min. Anschließend wurden die inhibierten Reaktionsansätze auf ein denaturierendes PAA-Gel (20 %) geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei 15 – 35 mA durchgeführt. Abschließend folgte die autoradiographische Detektion.

3.2.7 Aufreinigung

Ein Puffer, der bei sehr vielen Aufreinigungsschritten verwendet wurde, ist der Puffer A10. Zur Langzeitlagerung und zur Vorratshaltung wurde ein 5x Puffer hergestellt, jedoch ohne DTT. Bei Bedarf wurde der 5x Puffer mit ddH₂O zu 1x Puffer A10 verdünnt. DTT wurde erst nach der Verdünnung zu 1x Puffer A10 in der erforderlichen Menge hinzugefügt (Endkonzentration 6 mM DTT im 1x Puffer A10).

5x Puffer A10

250 mM	Tris/HCl pH 7,45
300 mM	NH ₄ Cl
50 mM	Mg(OAc) ₂

Der 5x Puffer A10 wurde autoklaviert und bei RT gelagert.

3.2.7.1 Zellaufschluss

Puffer A10

50 mM	Tris/HCl pH 7,45
60 mM	NH ₄ Cl
10 mM	Mg(OAc) ₂
6 mM	DTT

Die Gefäße mit den Zellen, der Zellsuspension und dem Zelllysatz wurden während des Aufschlussprozesses möglichst ununterbrochen auf Eis gekühlt.

3.2.7.1.1 Zellaufschluss mittels Sonifizierung

0,5 g *A. aeolicus*-Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Tube eingewogen. 10 ml vorgekühlter Puffer A10 (4 °C) wurden hinzugefügt und die Zellen wurden gevortext, bis sie möglichst gut resuspendiert waren. Anschließend wurde die Zellsuspension mittels Sonifizierung (Branson Sonifier 250) bei einer „Output control“ von 2 und einem Zyklus von 30 - 40 % für 10 min in einem Eiswasserbad aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Zelllysatz in einer „Eppendorf 5810R“-Zentrifuge bei 18500 x g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Falcon Tube überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.7.1.2 Zellaufschluss mittels French Press

Bei dieser Methode wurden 2 g Zellpellet in ein 50 ml Falcon Tube eingewogen. Vorgekühlter (4 °C) Puffer A10 wurde bis zur 20 ml-Markierung hinzugefügt und das Röhrchen in Intervallen gevortext, bis die Zellpellets möglichst gut resuspendiert waren. Die

Methoden

Zellsuspension wurde dann in eine 50 ml Spritze überführt und anschließend durch eine 0,9 mm Kanüle in ein leeres Falcon Tube gespritzt. Der Pressvorgang der Zellsuspension durch die Kanüle wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine auf 4 °C vorgekühlte, mit Ethanol p.a. (70 %) und demin. Wasser gespülte Zelle der French Press überführt. Zur quantitativen Überführung der Zellsuspension von einem Gefäß in ein anderes wurden zurückgebliebene Zellreste in 2 – 3 ml Puffer A10 aufgenommen, durch Schwenken resuspendiert und ebenfalls in das nächste Gefäß überführt. Der Zellaufschluss in der French Press (French Pressure Cell Press, American Instrument Company) erfolgte bei 1000 psi. Das Lysat wurde langsam tropfend in einem neuen Falcon Tube aufgefangen. Der Pressvorgang wurde mit jeder Präparation dreimal durchgeführt.

Ultrazentrifugation des French Press-Zelllysats

Das French Press-Zelllysat wurde im Anschluss an den Aufschluss für 1 h bei 35000 rpm in einem vorgekühlten Ti 70 Festwinkelrotor in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen, zu je 10 ml aliquotiert und bis zur Anionenaustausch-Chromatographie bei -80°C gelagert.

3.2.7.2 Fast performance liquid chromatography (FPLC)

Die Chromatographie wurde mit einer ÄKTA™ basic 10 (Amersham Biosciences) durchgeführt.

Alle Puffer und Lösungen für die Flüssigchromatographie wurden vor Gebrauch per Vakuumfiltration durch einen Sterilfilter (Filtropur V50 0.2 Vacuum, Sarstedt) entgast. Das Waschen, die Äquilibration und die Re-Äquilibration der Chromatographie-Säulen erfolgten nach Herstellerangaben, wenn nicht anders angegeben. Die Flüssigchromatographie wurde bei RT durchgeführt. Die aufzureinigenden Proben wurden dem Probenvolumen entsprechend zeitnah vor Beginn der Chromatographie aufgetaut (10 ml Probe: 30 - 40 min vorher, 5 ml Probe 15 – 20 min vorher und 0,5 – 1 ml Probe 5 min vorher). Das Probenreservoir der ÄKTA wurde vor dem Chromatographielauf mit ddH₂O gespült und mit dem Puffer äquilibriert, in welchem die Probe vorlag. Die eluierten Fraktionen wurden im Fraktionssammler direkt in 15 ml Falcon Tubes oder in 1,5 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen. Nach der Elution wurden die Falcon Tubes sofort in Eiswasser beziehungsweise die Eppendorfgefäße in Alublöcken auf Eis gelagert. Von den einzelnen Fraktionen wurden direkt nach der Chromatographie Aliquots für folgende Zwecke abgenommen: [1] Enzymtests auf RNase P-Aktivität (5 – 16 µl); [2] Proteinbestimmung nach Bradford (40 µl); [3] SDS-PAGE (15 µl) und [4] die massenspektrometrische Analyse (25 µl). Zur quantitativen Überführung der Fraktionen in andere Reaktionsgefäße wurden diese vor dem Transfer 1 bis 2 mal invertiert. Nach der Entnahme der Eluate wurden die Falcon Tubes bzw. Eppendorf-Gefäße kurz abzentrifugiert (4 °C) und die am Boden gesammelten Probenreste ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß überführt. Die Fraktionen und die entsprechenden Aliquots wurden zwischen den einzelnen Aufreinigungsschritten und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Methoden

3.2.7.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Puffer A10		DEAE-Elutionspuffer	
50 mM	Tris/HCl pH 7,45	50 mM	Tris/HCl pH 7,45
60 mM	NH ₄ Cl	1 M	NH ₄ Cl
10 mM	Mg(OAc) ₂	10 mM	Mg(OAc) ₂
6 mM	DTT	6 mM	DTT

Als Chromatographiematrix für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde Diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose Fast Flow eingesetzt. Das Material wurde in einen XK 16/20 Säulenkörper zu einer 20 ml-Säule gepackt.

Ein 10 ml-Aliquot eines Zellaufschlusses wurde 30 - 40 min vor Beginn der Chromatographie aufgetaut. Die Probe für die Anionenaustausch-Chromatographie wurde direkt vor dem Auftragen auf die Säule mit Hilfe eines Sterilfilteraufsatzes für Spritzen (Filtropur S 0.2, Sarstedt) filtriert. Dazu wurde zunächst der Stempel einer sterilen Spritze entfernt und ein Filteraufsatz auf die Spritze aufgesteckt. Die Spritze wurde mit dem Filter auf ein autoklaviertes 20 ml-Becherglas gestellt und die Probe in die Spritze überführt. Nach Einführung des Stempels konnte die Probe ohne Verluste direkt in das Becherglas filtriert werden. Von dort wurde sie mit einer neuen Spritze aufgenommen und in das Injektionsventil der ÄKTA überführt. Die Probe wurde dann in das Probenreservoir, einen 10 ml-Superloop, geladen. Als Start- und Äquilibrationpuffer wurde Puffer A10 verwendet, mit dem auch die Probe aus dem Probenreservoir auf die Säule transportiert wurde. Als Elutionspuffer wurde DEAE-Elutionspuffer verwendet. Die Flussrate bei der Aufreinigung betrug 2 ml/min. Bei der Programmierung einer Aufreinigungsmethode werden alle Volumina des Aufreinigungsprogramms als Säulenvolumina der eingesetzten Säule (Column Volume: CV) angegeben. Das Volumen der DEAE-Säule betrug 20 ml.

Zunächst wurde die Säule mit 3 CVs Startpuffer equilibriert, bevor die Probe aus dem Probenreservoir auf die Säule überführt wurde. Zur quantitativ vollständigen Überführung der Probe auf die Säule wurde das Probenreservoir mit dem 1,5-fachen Probenreservoir-Volumen an Startpuffer gespült. Nicht-bindendes Probenmaterial, der sogenannte „Flow through“, wurde dann mit 2 CVs Startpuffer ausgewaschen. Zur Elution des gebundenen Probenmaterials wurde ein Stufengradient angelegt (siehe Tabelle 3.3). Das Elutionsvolumen pro Stufe wurde auf 2,2 CVs festgelegt und der Anteil des Elutionspuffers wurde stufenweise gegenüber dem Anteil des Startpuffers um 10 % erhöht. Anhand von Vorexperimenten war bekannt, dass die RNase P-aktiven Fraktionen bei Stufe 3 eluieren. Deswegen wurde in der dritten Stufe zur besseren Abtrennung inaktiver von RNase P-aktiven Fraktionen ein kleineres Fraktionsvolumen gewählt.

Tabelle 3.3: Elutionsprogramm DEAE-Chromatographie

Elutionsstufe	Parameter	Einstellungen
Stufe 1	Elutionspuffer	10 %
	Startpuffer	90 %
	Elutionsvolumen	2,2 CV
	Fraktionsvolumen	4 ml
Stufe 2	Elutionspuffer	20 %
	Startpuffer	80 %
	Elutionsvolumen	2,2 CV
	Fraktionsvolumen	4 ml
Stufe 3	Elutionspuffer	30 %
	Startpuffer	70 %
	Elutionsvolumen	2,2 CV
	Fraktionsvolumen	2 ml
Stufe 4	Elutionspuffer	40 %
	Startpuffer	60 %
	Elutionsvolumen	2,2 CV
	Fraktionsvolumen	4 ml

Abschließend wurde die Säule mit 3 CVs Elutionspuffer (100 %) gewaschen, um restliche, an das Säulenbett gebundene, Komponenten auszuwaschen.

Von den bei Stufe 3 eluierten Fraktionen wurden je 5 µl auf RNase P-Aktivität getestet (3.2.6.2). Zusätzlich wurde ein Aliquot vom „Flow through“ getestet, um zu überprüfen, ob die Säule überladen war.

Nach der Auswertung des Enzymtests wurden die Fraktionen mit der höchsten RNase P-Aktivität gepoolt. Die gepoolten Fraktionen von 2 DEAE-Aufreinigungen wurden auf 1,5 - 3 ml ankonzentriert und mit 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 7,5) auf eine Endkonzentration von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt.

3.2.7.2.2 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

HIC-Startpuffer		Puffer A10	
50 mM	Tris/HCl pH 7,45	50 mM	Tris/HCl pH 7,45
60 mM	NH_4Cl	60 mM	NH_4Cl
10 mM	$\text{Mg}(\text{OAc})_2$	10 mM	$\text{Mg}(\text{OAc})_2$
1M	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 mM	DTT
6 mM	DTT		

Die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie wurde mit einer 5 ml-HiScreen Phenyl FF (*low sub*)-Säule durchgeführt. Direkt vor der HIC-Chromatographie wurde das auf 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellte Probenkonzentrat der DEAE-Fractionen mit HIC-Startpuffer auf 10 ml aufgefüllt. Auf diese Weise sollte der Verlust an Probe bei der anschließenden Filtration (infolge Benetzung / Adsorption an den Filter) reduziert werden. Die Filtration der Probe vor der Injektion in das Probenreservoir erfolgte, wie bereits bei der Anionenaustausch-Chromatographie (s.o.) beschrieben, mit Hilfe eines Sterilfilteraufsatzes für Spritzen (Filtropur S 0.2, Sarstedt). Anschließend wurde die Probe in das 10 ml-Probenreservoir (Superloop) geladen. Als HIC-Startpuffer wurde Puffer A10 mit zusätzlich 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verwendet und als Elutionspuffer Puffer A10 ohne Zusatz. Da sowohl der Säulenkörper als auch die Chromatographiematrix nur einem begrenztem Maximaldruck ausgesetzt werden

Methoden

dürfen, variierte die Flussrate zwischen 1 - 2 ml/min, entsprechend dem Gegendruck, der sich während der Chromatographie entwickelte. Wie bei den Einstellungen für die Anionenaustausch-Chromatographie bezogen sich die Angaben bei der Programmierung der HIC-Aufreinigung auf das Volumen der verwendeten Säule (Column Volume: CV). Das Volumen der HiScreen Phenyl FF-Säule betrug 5 ml.

Die Säule wurde zunächst mit 5 CVs HIC-Startpuffer äquilibriert. Zur quantitativen Überführung der Probe aus dem Superloop auf das Säulenbett wurde die Probe mit dem 1,5-fachen Volumen des Probenreservoirs an HIC-Startpuffer aus dem Superloop auf die Chromatographie-Matrix gespült. Der „Flow through“, nicht-bindendes Probenmaterial, wurde dann mit 2 CVs HIC-Startpuffer ausgewaschen. Zur Elution wurde ein Stufengradient gewählt, bei dem sich der Anteil des HIC-Startpuffers gegenüber dem des Elutionspuffers um 20 % je Elutionsstufe verringerte. Das Elutionsvolumen jeder Stufe betrug das 5-fache Säulenvolumen. Die Fraktionen wurden in Volumina zwischen 10 und 12,5 ml gesammelt. Für den HIC-Stufengradienten wurden folgende Einstellungen gewählt:

Tabelle 3.4: Elutionsprogramm Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Elutionsstufe	Parameter	Einstellungen
Stufe 1	Elutionspuffer	20 %
	Startpuffer	80 %
	Elutionsvolumen	5 CV
	Fraktionsvolumen	11 ml
Stufe 2	Elutionspuffer	40 %
	Startpuffer	60 %
	Elutionsvolumen	5 CV
	Fraktionsvolumen	12,5 ml
Stufe 3	Elutionspuffer	60 %
	Startpuffer	40 %
	Elutionsvolumen	2,2 CV
	Fraktionsvolumen	10 ml
Stufe 4	Elutionspuffer	80 %
	Startpuffer	20 %
	Elutionsvolumen	5 CV
	Fraktionsvolumen	10 ml
Stufe 5	Elutionspuffer	100 %
	Startpuffer	0 %
	Elutionsvolumen	5 CV
	Fraktionsvolumen	10 ml

Aus der Optimierungsphase der HIC-Aufreinigung war bekannt, dass die Eluate der 2. Stufe des HIC-Gradienten (Elution bei 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) keine RNase P-Aktivität aufweisen. Diese Fraktionen aus der 2. HIC-Elutionsstufe wurden als „Negativ-Kontrollen“ für spätere Experimente verwendet und bei der folgenden Dialyse und Ankonzentrierung genauso behandelt wie die RNase P-aktiven Eluate aus der 3. und 4. Stufe des HIC-Gradienten.

Die bei Stufe 2, 3, 4 und 5 eluierten Fraktionen wurden den Elutionsstufen entsprechend getrennt gepoolt und diese Pools ebenfalls getrennt voneinander weiter aufgereinigt. Die folgenden Schritte wurden (jeweils separat) für die Eluate der HIC-Stufen 2 [0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 3 [0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] und 4 [0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] durchgeführt. Erfolgte zwischenzeitlich eine Lagerung der HIC-Eluate bei -80 °C, so wurden nach dem Auftauen vorhandene Präzipitate durch Invertieren wieder gelöst. Die Fraktionspools aus den

Methoden

einzelnen HIC-Stufen 2, 3 und 4 wurden über Nacht gegen das 10 bis 15-fache Volumen Puffer A10 dialysiert (3.2.5.4).

Nach der Dialyse wurden die Dialysate separat auf 500 – 750 µl ankonzentriert (3.2.5.6). Die Eluate der HIC-Stufe 5 wurden ebenfalls, ohne vorherige Dialyse, gepoolt und ankonzentriert (der Elutionspuffer bei Stufe 5 entspricht 100 % Puffer A10). Von jedem dialysierten HIC-Konzentrat der einzelnen HIC-Elutionsstufen wurde ein Enzymtest auf RNase P-Aktivität durchgeführt (siehe 3.2.6.2, Probenvolumen: 1 - 2 µl).

3.2.7.2.3 Größenausschluss-Chromatographie (Gelchromatographie)

Puffer A10		Puffer A260	
50 mM	Tris/HCl pH 7,45	50 mM	Tris/HCl pH 7,45
60 mM	NH ₄ Cl	260 mM	NH ₄ Cl
10 mM	Mg(OAc) ₂	10 mM	Mg(OAc) ₂
6 mM	DTT	6 mM	DTT

Nach der Anionenaustausch-Chromatographie (3.2.7.2.1) und der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie (3.2.7.2.2) folgte eine Größenausschluss-Chromatographie der RNase P-aktiven Fraktionen. Da der Gesamt-Protein/RNA-Gehalt einer Probe mit zunehmendem Aufreinigungsgrad abnimmt, sinkt auch die UV-Absorption im Detektor der ÄKTA. Eine schwache UV-Absorption würde sich erschwerend auf die Auswertung des Chromatogramms auswirken. Außerdem könnte bei einer SDS-PAGE-Analyse der eluierten Gelchromatographie-Fraktionen - je nach angewandter Färbemethode - die Detektionsgrenze unterschritten werden. Aus diesem Grund erfolgte vor der Gelchromatographie ein Vereinigen von ankonzentrierten Dialysaten, die bei der gleichen Elutionsstufe in vorangegangenen HIC-Läufen eluiert worden waren. Konkret wurden 3 - 4 ankonzentrierte Dialysate der HIC-Stufe 4 vereinigt, während es 1,5 - 2 für die HIC-Stufe 3 waren. Da die Trennleistung bei einer Gelchromatographie unter anderem auch vom Ausgangsvolumen der Probe abhängig ist (das Probenvolumen sollte 0,5 % bis maximal 1 % des Säulenvolumens betragen), wurde das Volumen der vereinigten dialysierten HIC-Konzentrate auf 125 – 150 µl ankonzentriert (3.2.5.6). Danach wurden die Proben direkt vor der Aufreinigung mit Ultrafree[®]-MC Centrifugal Filters (0,22 µm; Millipore) nach Herstellerangaben filtriert. Schließlich wurden die dialysierten und ankonzentrierten RNase P-aktiven Fraktionen der HIC Elutionsstufe 3 (0,4 M (NH₄)₂SO₄) und Stufe 4 (0,2 M (NH₄)₂SO₄) in separaten Chromatographieläufen aufgereinigt.

Für die Größenausschluss-Chromatographie wurde eine kalibrierte Superose 6 10/300 GL-Säule verwendet (Säulenvolumen: 24 ml). Dialysierte und ankonzentrierte Fraktionen der HIC-Stufe 3 wurden mit Puffer A260 und ankonzentrierte Dialysate der HIC-Stufe 4 mit Puffer A10 eluiert. Die Elution erfolgte mit dem 1,25-fachen Säulenvolumen (30 ml) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min. Die Elutionsfraktionen wurden direkt in Eppendorfgefäße zu je 0,5 ml fraktioniert. Von Fraktionen, die ab dem Zeitpunkt der Probeninjektion (Elutionsvolumen = 0 ml) zwischen 9 ml und 20 ml eluierten, wurden direkt nach der Elution Aliquots für einen RNase P-Aktivitätstest (3.2.6.2; 10–16 µl), eine Proteinbestimmung nach Bradford (3.2.5.5; 40 µl), eine SDS-PAGE-Analyse (3.2.5.1; 15 µl) sowie für die massenspektrometrische Analyse (3.2.5.3.2; 25 µl) entnommen. Für den Enzymtest auf RNase P-Aktivität wurden jeweils 10 – 16 µl Probe bei 10 mM Mg²⁺ getestet. Im Falle einer anschließenden RNA- und

Methoden

Protein-Extraktion (3.2.7.3) aus den eluierten Gelchromatographie-Fractionen wurden, basierend auf der Auswertung des Aktivitätstests, die Fractionen mit der höchsten RNase P-Aktivität gepoolt und weiter ankonzentriert. Die RNase P-aktiven Pools aus Läufen, bei denen Eluate der HIC-Stufe 4 als Probe aufgetragen wurden, wurden um den Faktor 42 eingeeengt, jene aus Läufen mit Proben der HIC-Stufe 3 um den Faktor 35.

3.2.7.3 RNA- und Protein-Extraktion aus aufgereinigtem *A. aeolicus* Lysat

Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer		Rec-4 Puffer	
20 mM	Tris/HCl pH 7,4	20 mM	Tris/HCl pH 7,4
4 mM	Mg(OAc) ₂	4 mM	Mg(OAc) ₂
400 mM	NH ₄ Cl	400 mM	NH ₄ Cl
0,16 mM	EDTA	0,16 mM	EDTA
6 M	Harnstoff	4 mM	DTT
4 mM	DTT		

Die Methode zur Präparation der Proteine und der RNA aus dem vorgereinigten Lysat von *A. aeolicus* basiert auf einem Protokoll zur Essigsäureextraktion ribosomaler Proteine (Hartmann 1983). In der vorliegenden Arbeit wurden der Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer und Rec-4 Puffer mit jeweils 0,16 mM EDTA anstelle von 0,2 mM EDTA angesetzt und anstelle von β -Mercaptoethanol wurde DTT eingesetzt. Zu ankonzentrierten Fractionen aus der Größenausschluss-Chromatographie (3.2.7.2.3) oder zu dialysierten, gepoolten HIC-Fractionen (3.2.7.2.2) - beide im Folgenden als Ausgangskonzentrat bezeichnet - wurde 1/10 Vol. eiskaltes Mg(OAc)₂ (1 M) und 2 Vol. eiskalte Essigsäure (100 %, p.a.) hinzugefügt. Die Proben wurden in Eppendorfgefäßen in einem Aluminiumblock auf Eis bei 200 rpm für 45 min geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 4 °C und 10000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge Fresco). Im Pellet befand sich die gefällte RNA und im Überstand befanden sich die Proteine. Der Protein-haltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 5 Vol. eiskaltem Aceton wurde der Ansatz 1 bis 2 mal invertiert und die Proteine wurden über Nacht bei -20 °C gefällt. Das RNA-Pellet der Magnesiumacetat/Essigsäure-Extraktion wurde in dem 5-fachen Volumen Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer gelöst und bis zur Dialyse bei -20 °C gelagert. Nach der Aceton-Fällung der Proteine wurden die Proben 1 h bei 11000 x g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein-Pellet wurde 5 min auf Eis luftgetrocknet. Anschließend wurde das Protein-Pellet im 20-fachen Volumen (bezogen auf das Ausgangskonzentrat) Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer gelöst und über Nacht gegen das 10000-fache Volumen (bezogen auf das Ausgangskonzentrat) Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer bei 4 °C dialysiert. In entsprechender Weise wurde die in Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer gelöste RNA zunächst mit Rec-4/6 M Harnstoff-Puffer auf das 20-fache Volumen des Ausgangskonzentrats aufgefüllt und in einem separaten Becherglas gegen das 10000-fache Volumen Rec-4/ 6 M Harnstoff-Puffer über Nacht dialysiert. Bei diesem Dialyseschritt erfolgte kein Pufferwechsel, da das Verhältnis vom Dialysepuffer-Volumen zum Ausgangsvolumen der Probe ausreichend groß war. Nach der Dialyse gegen den Harnstoff-haltigen Puffer wurden die Dialyseschläuche in das 5000-fache Volumen Rec-4 Puffer überführt und 45 min gegen den Harnstoff-freien Puffer dialysiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Dialyseschritt für 30 min gegen frischen Rec-4 Puffer. Während der Dialyse gegen den Harnstoff-freien

Methoden

Puffer wurde in regelmäßigen Abständen geprüft, ob eine Trübung des Dialysats eintritt. Wenn dies der Fall war, wurde die Dialyse sofort abgebrochen. Nach der Dialyse wurden die Proben für 30 min bei 4000 x g (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände der Protein- und RNA-Präparation wurden in separate Zentrifugationsfiltereinheiten überführt und auf das 1,5-fache Volumen - bezogen auf das Volumen des Ausgangskonzentrats – ankonzentriert. Mit den Protein-Proben wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (3.2.5.5) durchgeführt. Die Protein-Proben wurden bei -80 °C gelagert. Die RNA-Proben wurden über Nacht mit Ethanol gefällt (3.2.2.2.1). Im Anschluss daran wurde das RNA-Pellet noch einmal mit dem 2,5-fachen Vol. Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 30 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in Puffer A10 gelöst. Mit einem Aliquot der RNA wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt und das Absorptionsverhältnis $A_{260} : A_{280}$ bestimmt (3.2.2.5). Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Mehrstufige Aufreinigungsmethode zur Anreicherung der RNase P aus *Aquifex aeolicus*

Prä-tRNAs werden von der Ribonuklease P (RNase P) durch endonukleolytische Abspaltung der 5'-Flanke zu muren tRNAs prozessiert. In Bakterien setzt sich die RNase P aus einer katalytischen RNA-Untereinheit und einer Protein-Untereinheit zusammen. Die RNA-Untereinheit ist in Bakterien auf dem *rnpB*-Gen und die Protein-Komponente auf dem *rnpA*-Gen kodiert. Die fehlende Annotation sowohl eines *rnpB*- als auch *rnpA*-Gens im Genom von *A. aeolicus* (Swanson 2001) gaben den Anlass, mit unterschiedlichen Ansätzen nach RNase P-Untereinheiten und Genen zu suchen, die für diese Untereinheiten kodieren. So wurde z. B. versucht, die RNA-Untereinheit mittels eines experimentellen RNomics-Ansatzes zu identifizieren (Willkomm *et al.* 2005). Obgleich der Nachweis für eine RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* unter speziellen Pufferbedingungen erbracht werden konnte (Marszalkowski *et al.* 2008), blieben jedoch auch Versuche ergebnislos, RNase P-Komponenten mittels bioinformatischer Ansätze zu identifizieren (Hartmann and Hartmann 2003), (Li and Altman 2004a), (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck). Einen biochemischen Ansatz verfolgend, habe ich in meiner Arbeit eine semipräparative/-analytische und reproduzierbare Aufreinigungsmethode zur Anreicherung der RNase P-Aktivität aus *Aquifex aeolicus* entwickelt.

4.1.1 Zellaufschluss

Die ersten Zellaufschlüsse wurden mittels Sonifizierung (3.2.7.1.1) durchgeführt. Im Anschluss wurden die per Ultraschall aufgeschlossenen Zellen bei 18500 x g (4 °C) abzentrifugiert. Später wurde die Methode für den Zellaufschluss gewechselt und der Aufschluss erfolgte durch dreimaliges Passagieren resuspendierter Zellen durch eine French Press-Zelle (3.2.7.1.2). Im Gegensatz zur Sonifizierung, bei der die Zellen durch Scherkräfte aufgeschlossen werden, erfolgt der Zellaufschluss in einer French Press durch Druck. Bei der Ultrazentrifugation des French Press-Zellaufschlusses bei 35000 rpm (3.2.7.1.2) konnten unlösliche Zellbestandteile effektiv abgetrennt werden. Gleichzeitig wurde durch die Ultrazentrifugation das Ankonzentrieren der Proben in Zentrifugations-Filtereinheiten (siehe 4.1.4.1.1) erleichtert. Die Art und Weise der Vorbehandlung einer Probe hatte einen erheblichen Einfluss auf die Trenneffizienz des folgenden Aufreinigungsschrittes. Der Wechsel von der Sonifizierung zur French Press-Methode beim Zellaufschluss hat dazu beigetragen, dass bereits beim ersten Aufreinigungsschritt, der Anionenaustausch-Chromatographie, eine dreifache Verbesserung in der Aufreinigungseffizienz erzielt werden konnte.

4.1.2 Anionenaustausch-Chromatographie

Bei der Anionenaustausch-Chromatographie werden aufzureinigende Probenbestandteile der Stärke ihrer negativen Ladung entsprechend getrennt. Als Chromatographiematrix wurde hier Diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose Fast Flow eingesetzt. Das Material ist ein schwacher Anionenaustauscher. Probenbestandteile, die am pH-Wert der Chromatographie-Puffer negativ geladen sind, binden an die Säulenmatrix. Der pH-Wert der verwendeten

Ergebnisse und Diskussion

Chromatographie-Puffer war pH 7,45. Bei den Enzymtests von eluierten Chromatographie-Fractionen auf RNase P-Aktivität wurde der „Flow through“ jeweils mitgetestet. Der „Flow through“ ist das nicht an die Matrix bindende Probenmaterial, das nach dem Auftragen der Probe auf die Säule mit dem Startpuffer ausgewaschen wird. Da in den „Flow through“-Fractionen keine RNase P-Aktivität nachgewiesen wurde, lässt sich daraus schließen, dass die RNase P-Komponenten aus *A. aeolicus* bei dem vorliegenden pH-Wert vollständig an die DEAE-Sephrose gebunden haben. Das bedeutet, dass sie bei dem bestehenden pH-Wert überwiegend negative Ladungen tragen. Die Beobachtung stimmt mit den Eigenschaften überein, die für ein typisches bakterielles RNase P-Enzym zu erwarten wären. Bakterielle RNase P-Enzyme setzen sich im Allgemeinen aus einer basischen Protein-Untereinheit der Größe 13 – 14 kDa und aus einer RNA-Untereinheit der Größe 100 – 130 kDa zusammen. Die wesentlich größere negativ geladene RNA-Untereinheit bestimmt bei einem herkömmlichen bakteriellen RNase P-Enzym dessen negative Nettoladung. Das Bindungs- und Elutionsverhalten (s. unten) des Zellaufschlussmaterials von *A. aeolicus* bei pH 7,45 deutet somit auf eine überwiegend negative Ladung und saure Eigenschaften des Enzyms hin. Als Elutionsmethode wurde ein Stufengradient gewählt. Die Ammoniumchlorid-Konzentration im Startpuffer betrug 60 mM und im Elutionspuffer 1 M. Der Anteil des Elutionspuffers im Verhältnis zum Startpuffer wurde in 10 %-Stufen erhöht, beginnend bei 100 % Startpuffer und 0 % Elutionspuffer. Die RNase P-aktiven Fractionen eluierten bei Stufe 3 des Stufengradienten, also bei ca. 340 mM NH_4Cl (Abb. 4.1).

Im Vergleich zu der Trennungseffizienz, die mit der bisher angewandten Elutionstechnik - Elution mit einem linearen Gradienten - erzielt wurde, konnte der Aufreinigungsgrad durch Anlegen eines Stufengradienten schon im ersten Aufreinigungsschritt um den Faktor 3 verbessert werden. Durch Anlegen eines Stufengradienten konnten bei der Anionenaustausch-Chromatographie drei große (gemessen an der Höhe der A_{260} -Absorption) nicht-RNase P-aktive Fractionen von der RNase P-aktiven Fraction getrennt werden. Mit einem linearen Gradienten hingegen konnte nur eine Fraction von dem RNase P-aktiven Material separiert werden. Der Zellaufschluss per French Press mit anschließender Ultrazentrifugation, der dem ersten Aufreinigungsschritt voranging, hat ebenfalls zur Verbesserung der Aufreinigungseffizienz beigetragen.

Ergebnisse und Diskussion

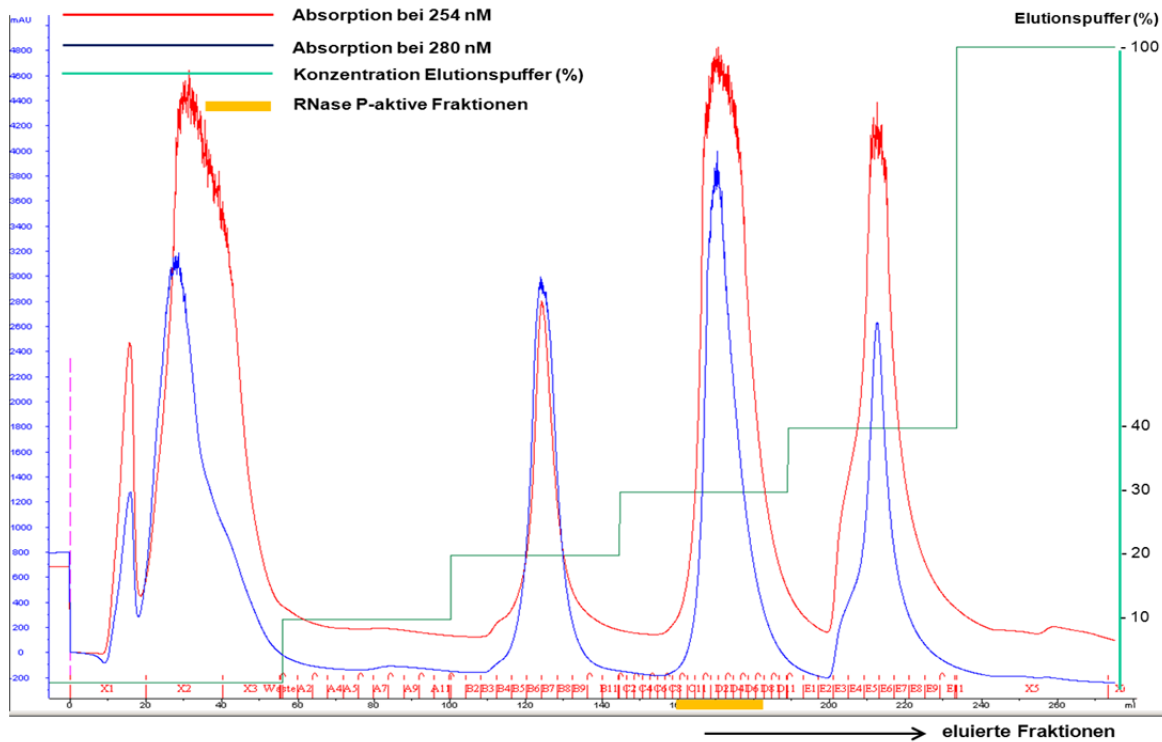


Abbildung 4.1: Repräsentatives Chromatogramm einer DEAE-Aufreinigung (Sepharose Fast Flow). X1 - X3: Durchflussfraktionen (= Flow through); A1 - E11: fraktionierte Eluate. Die RNase P-aktiven Fraktionen eluierten in den Fraktion C8 - D7 (gelb gekennzeichnet).

4.1.3 Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zunächst wurde die Eignung einer Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation als zweiter Aufreinigungsschritt nach der DEAE-Chromatographie untersucht. Dazu wurden gleiche Volumina von Sucroslösungen abnehmender Konzentration in ein Zentrifugenglas vorsichtig übereinander geschichtet, so dass folgender Stufengradient entstand: 50 % - 40 % - 30 % - 20 % - 15 % - 10 % - 5 %. Auf den Gradienten wurden 500 µl einer RNase P-aktiven DEAE-gereinigten Fraktion von *A. aeolicus* aufgetragen. Anschließend wurde der Gradient bei 25000 rpm für 20 h bei 4 °C in einem SW 41 Rotor (Beckman Coulter) zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die Schichten vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in separate Eppendorf-Gefäße überführt. Jeweils 10 µl jeder Konzentrationsstufe wurden in einem Enzymtest auf RNase P-Aktivität (3.2.6.2) getestet. In den Proben der Konzentrationsstufen 5 %, 10 %, 15 % und 20 % konnte RNase P-Aktivität detektiert werden, wobei die Aktivität in der Stufe mit 10 % - Sucroslösung am stärksten war. Daraufhin wurde eine zweite Dichtegradienten-Zentrifugation mit Sucroslösungen von 2,5 – 25 % durchgeführt. Der Stufengradient setzte sich bei diesem Versuch wie folgt zusammen: 25 % - 20 % - 15 % - 12,5 % - 10 % - 7,5 % - 5 % - 2,5 %. Die Zentrifugation wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, außer dass 4 h länger (insgesamt 24 h) zentrifugiert wurde. Das Ergebnis des anschließenden RNase P-Aktivitätstests mit jeweils 10 µl Probe jeder Sucrose-Stufe zeigte, dass die RNase P-Aktivität in den Stufen 5 % bis 20 % angereichert war. Die maximale Enzymaktivität wurde wieder in der 10 % - Sucroslösung detektiert. Da sich die RNase P-Aktivität aber über einen so großen Konzentrationsbereich der Sucroslösungen verteilte und keine effektive Anreicherung möglich war, wurde diese Aufreinigungsmethode nicht weiter verfolgt.

4.1.4 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

4.1.4.1 Vorversuche zur Hydrophoben Interaktions-Chromatographie

4.1.4.1.1 Proben-Ankonzentrierung

Um das Probenvolumen der RNase P-aktiven DEAE-Fractionen auf ein Maß einzuengen, das für den folgenden Aufreinigungsschritt geeignet ist, wurden verschiedene Methoden der Ankonzentrierung ausgetestet, die im Folgenden kurz beschrieben sind.

Reverse Dialyse

Eine schonende Methode ist die reverse Dialyse. Dabei wird eine Substanz, die viel Wasser aufnehmen kann, gleichzeitig aber sehr reaktionsträge ist, in einen Dialyseschlauch gefüllt und dieser wird in die einzuengende Probe gegeben. Die reverse Dialyse wurde mit Sephadex G 100 und mit Polyethylenglycol (40000) getestet, aber nicht weiter verfolgt, da die Effektivität der Ankonzentrierung im Verhältnis zur Dauer der Methode unvorteilhaft war.

Vakuumkonzentrator („SpeedVac“)

Als weitere Methode zum Einengen des Probenmaterial-Volumens wurde die Ankonzentrierung per *Speed Vac* ausprobiert. Das Probenvolumen konnte bei 45 °C in 2,5 h um den Faktor 15 ankonzentriert werden. Ein Nachteil der Methode bestand darin, dass mit dem zur Verfügung stehenden Gerät nur Probenvolumina $\leq 1,5$ ml ankonzentriert werden konnten. Das Volumen der vereinigten RNase P-aktiven DEAE-Fractionen betrug jedoch 18 - 22 ml und hätte eine entsprechende Aliquotierung erfordert. Zudem steigt in der *Speed Vac* durch Verdampfen des Lösungsmittels die Ionenkonzentration in der Probe stark an und nach hinreichender Ankonzentrierung war das Volumen der *Speed Vac*-Konzentrate für eine anschließende Mini-Dialyse zu gering (Mindestvolumen 300 µl).

Zentrifugationsfiltereinheiten

Bei den zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Zellaufschlüssen mittels Ultraschall erfolgte die anschließende Zentrifugation von aufgeschlossenen Zellen bei 18500 x g (3.2.7.1.1). Das Einengen von Überständen dieser Zentrifugation (bei 18500 x g) war mit Zentrifugations-Filtereinheiten aufgrund der wiederholten Verstopfung mehrerer, nacheinander verwendeter Filter erschwert und nur um den Faktor 3 möglich. Aus diesem Grund wurde versucht, eine Verbesserung des Filtrationsverhaltens durch eine vorangehende DNase-Behandlung zu erreichen. Dazu wurde die Probe vor der Ankonzentrierung mit RNase-freier DNase (0,1 U/µl im Inkubationsansatz) für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit EGTA (Endkonzentration 2,2 mM) für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Die DNase-Behandlung zeigte im Enzymtest keinen Einfluss auf die RNase P-Aktivität des *A. aeolicus* Zelllysates. Eine Verbesserung der Ankonzentrierung mittels Zentrifugations-Filtereinheiten konnte durch die DNase-Behandlung jedoch nicht erreicht werden. Bei den später durchgeführten Zellaufschlüssen mittels French Press erfolgte die Zentrifugation im Anschluss an den Zellaufschluss bei 35000 rpm in einer Ultrazentrifuge (3.2.7.1.2). Auf diese Weise konnten partikuläre und unlösliche Zellbestandteile effektiv abgetrennt werden. Die Volumina von Überständen dieser ultrazentrifugierten Zelllysate konnten mittels Zentrifugations-Filtereinheiten um den Faktor 40 reduziert werden, sodass hier gegenüber den anderen Methoden eine deutlich effizientere Ankonzentrierung erreicht wurde. Gleichzeitig erwies sich die Methode als schnell und gut zu handhaben und wurde daher standardmäßig zur Ankonzentrierung von Probenmaterial aus *A. aeolicus* verwendet.

4.1.4.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Bei der HIC (3.2.7.2.2) werden Probenbestandteile entsprechend ihrer Hydrophobizität getrennt. Hydrophobe Wechselwirkungen werden in wässriger Lösung unter anderem durch die darin gelösten Salze beeinflusst. Chaotrope Salze beeinflussen die Ordnung von Wassermolekülen und verringern dadurch hydrophobe Wechselwirkungen. Antichaotrope Salze werden bei der HIC zur Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem Probenmaterial und der hydrophoben Chromatographiematrix eingesetzt. Die Probe wird zunächst in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines antichaotropen Salzes auf die hydrophobe Matrix aufgetragen. Anschließend werden an die Matrix gebundene Komponenten durch abnehmende Konzentrationen des Salzes wieder von der Matrix eluiert. Für die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie wurde in dieser Arbeit Ammoniumsulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ verwendet, das starke antichaotrope Eigenschaften aufweist. Zunächst wurde die Löslichkeit der RNase P-Aktivität in Gegenwart verschiedener Konzentrationen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ untersucht. Ziel war die Ermittlung der maximalen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration, bei welcher die DEAE-Fractionen noch auf die HIC-Säule geladen werden können, ohne dass die RNase P-Aktivität ausfällt. Dazu wurden ankonzentrierte RNase P-aktive DEAE-Fractionen (250 - 875 μl , 3.2.7.2.1) durch Zugabe einer 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stammlösung auf Endkonzentrationen von 0,5 M bis 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt. Das Endvolumen nach der Ammoniumsulfat-Zugabe betrug jeweils 1 ml. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen RNase P-haltigen Aliquots betrugen jeweils 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nachdem die Proben zur Fällung für 1 h auf einem Schüttelinkubator bei 800 rpm / 4 °C inkubiert worden waren, wurden sie an einer vertikal drehenden Rotorscheibe befestigt und für 30 min bei 4 °C rotiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 30 min bei 10000 rpm in einer Tischzentrifuge (4 °C) wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und je 10 μl einem Enzymtest auf RNase P-Aktivität (3.2.6.2) unterzogen. Die Auswertung des Aktivitätstests ergab, dass in Gegenwart von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nur noch eine marginale RNase P-Aktivität im Überstand der Probe detektierbar war. In Gegenwart von 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte keine RNase P-Aktivität mehr im Überstand bestimmt werden. Ein Verlust der Enzymaktivität kann einerseits auf die hohen Ammoniumsulfat-Konzentrationen im Reaktionsansatz beim Aktivitätstest zurückzuführen sein. Andererseits kann ein Aktivitätsverlust durch Ausfällen des RNase P-aktiven Enzyms verursacht werden. Zur Klärung dieser Frage, ob die RNase P-Aktivität durch hohe Salzkonzentrationen beeinflusst wird, wurde eine Umpufferung bei den einzelnen Proben vorgenommen. Dazu wurden die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -haltigen Überstände in Zentrifugations-Filtereinheiten (Ausschlussgröße 10 kDa) überführt. Durch zweimaliges Ankonzentrieren der Proben um den Faktor 4, jeweils mit anschließender Wiederherstellung des Ausgangsvolumens durch Zugabe von Puffer A10, wurde das Milieu der Proben auf Puffer A10 eingestellt. Abschließend wurden die Proben nochmals um Faktor 2 ankonzentriert, bevor sie erneut einem Enzymtest auf RNase P-Aktivität unterzogen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die RNase P-Aktivität in den Proben, die aus den Überständen der Fällungen mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 2,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hervorgingen, durch die Umpufferung wieder teilweise regeneriert werden konnte. Folglich wurde die Enzymaktivität der *A. aeolicus* RNase P durch erhöhte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen inhibiert und das Ergebnis von RNase P-Aktivitätstests von Fractionen aus HIC-Aufreinigungen entsprechend verfälscht. Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer Dialyse der Ammoniumsulfat-haltigen Elutionsfractionen vor RNase P-Aktivitätstests. In weiteren Tests wurde schließlich die

Löslichkeit der RNase P-Aktivität mittels Enzymtests (3.2.6.2) an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -behandelten und anschließend dialysierten Proben untersucht. Dazu wurden RNase P-aktive DEAE-Fractionen auf eine Konzentration von 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt. Anschließend erfolgte eine einstündige Rotation an einer vertikal drehenden Rotorscheibe bei 4 °C. Nach einem Zentrifugationsschritt (60 min, 4 °C, 11000 x g) wurden der Überstand und das in Puffer A10 resuspendierte Pellet separat gegen Puffer A10 dialysiert. Anschließend wurde die RNase P-Aktivität der um Faktor 8 ankonzentrierten Dialysate sowohl des Überstands als auch des Pellets bestimmt. Als Ergebnis konnte im gelösten Pellet und im Überstand der Fällungsreaktionen eine vergleichbare RNase P-Aktivität bestimmt werden. Demnach kommt es bei Konzentrationen von 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bereits zu einem partiellen Ausfällen der RNase P von *A. aeolicus*. In diesem Zusammenhang musste für die weitere Aufreinigung mittels HIC berücksichtigt werden, dass die Effizienz einer Ammoniumsulfatfällung von der Konzentration abhängt, in der das zu fällende Protein vorliegt. Die genaue Konzentration des gesuchten RNase P-Enzyms in den ankonzentrierten DEAE-Fractionen war jedoch unbekannt.

4.1.4.1.3 Test hydrophober Matrices

Chromatographiematerialien haben unterschiedlich stark ausgeprägte hydrophobe Eigenschaften. Die Stärke der Hydrophobizität einer Matrix für HIC beeinflusst die Trennungseffizienz bei der Aufreinigung. Als hydrophobe Materialien wurden Phenyl-Sepharose (*low sub*) und Octyl-Sepharose getestet. Phenyl-Sepharose gilt als geeignet für intermediäre Aufreinigungsschritte. Sie ist weniger hydrophob als Octyl-Sepharose und es braucht nur milde Pufferbedingungen zur Elution. Octyl-Sepharose ist für eher schwach hydrophobe Proben geeignet. In Vorversuchen zur Aufreinigung der *A. aeolicus* RNase P konnte bei Chromatographien mit Octyl-Sepharose nur eine Trennung der Probe in nicht-bindende und bindende Bestandteile erzielt werden. Dabei konnte die RNase P-Aktivität in der bindenden Fraktion nachgewiesen werden. Bei Chromatographien mit Phenyl-Sepharose hingegen konnte eine Trennung der an die Matrix bindenden Probenbestandteile in drei separate Fraktionen erzielt werden. Bei anschließenden Enzymtests wurde auch nach der Phenyl-Sepharose-Aufreinigung die RNase P-Aktivität in den bindenden Fraktionen nachgewiesen. Da mit dieser Matrix eine Separation der bindenden Probenbestandteile in drei Fraktionen möglich war, wurde Phenyl-Sepharose als geeignete Matrix für die HIC gewählt. Dabei galt es, die Trenneffizienz durch die Wahl geeigneter Elutionsmethoden noch zu optimieren (siehe unten, 4.1.4.2: „Optimierung der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie“).

Bei den Tests der beiden hydrophoben Matrices wurde auch die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration ermittelt, die als Ausgangsbedingung (Startkonzentration) für eine HIC geeignet war. Dazu wurde auf beiden getesteten hydrophoben Matrices jeweils eine Chromatographie mit Ausgangsbedingungen von 2 M, 1,5 M und 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ getestet. Der Trenneffekt war bei einer Ausgangskonzentration von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ deutlich besser als in den Chromatographie-Läufen, bei denen höhere Salzkonzentrationen als Ausgangsbedingungen vorlagen. Auch unter Berücksichtigung der Versuchsergebnisse zur Löslichkeit der *A. aeolicus* RNase P-Aktivität bei verschiedenen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen (4.1.4.1.2) wurde die Startkonzentration der HIC auf 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt, bevor eine stufenweise Elution mit abnehmender Salzkonzentration erfolgte (= Stufengradient-Modell).

4.1.4.1.4 Mini-Dialyse

Nach der Elution von der HIC-Säule mittels Stufengradient lagen die eluierten Fraktionen in Puffern mit unterschiedlichen und hohen Salzkonzentrationen vor.

Zur schnellen Analyse der eluierten Fraktionen mittels Enzymtest (3.2.6.2) wurde die Methode der Mini-Dialyse etabliert (3.2.5.4.1). Diese Methode ermöglichte ein schnelles Screening der Elutionsfraktionen bezüglich des Elutionsverhaltens RNase P-aktiver Fraktionen und der Trenneffizienz des jeweiligen Elutionsprogramms. Im Anschluss daran konnten gezielt RNase P-aktive Fraktionen gepoolt und einer großen Dialyse unterzogen werden.

4.1.4.2 Optimierung der Hydrophoben Interaktions-Chromatographie

Die Ergebnisse der Aktivitätstests zeigten, dass RNase P-aktive Fraktionen getrennt bei Stufe 3 (0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und bei Stufe 4 (0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) eluieren. Im Verlauf der Optimierung des Elutionsprogramms erfolgte auch bereits bei Stufe 2 (0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) eine Elution RNase P-aktiver Komponenten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Säule überladen war und die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Probe und Säulenmatrix bei 0,6 M Ammoniumsulfat im Vergleich zum später optimierten und etablierten Aufreinigungsprotokoll geringer war.

4.1.4.3 Fazit der Entwicklung des HIC-Aufreinigungsschritts

Die mittels HIC aufzureinigenden RNase P-aktiven DEAE-Fraktionen wurden zunächst mit Zentrifugations-Filtereinheiten ankonzentriert. Daraufhin wurden die Konzentrate mit einer 4 M Stammlösung auf eine Endkonzentration von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt. Bei dieser Konzentration ist die RNase P-Aktivität noch löslich und bindet zugleich vollständig an die Phenyl-Sepharose-Matrix. Zugleich ist die Trenneffizienz dieser hydrophoben Matrix, die eine sehr gute weitere Auftrennung der vorgereinigten *A. aeolicus*-Fraktionen gewährleistet, bei einer Ausgangskonzentration von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ optimal. Nach dem Auftragen auf die hydrophobe Matrix erfolgte die Elution durch Anlegen eines Stufengradienten mit abnehmenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen. Zur Herstellung des Gradienten wurde der Anteil des Startpuffers (enthält 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) im Verhältnis zum Elutionspuffer (enthält kein $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in 20 %-Stufen erniedrigt, beginnend bei 100 % Startpuffer und 0 % Elutionspuffer. Nach einer für diesen Zweck etablierten Mini-Dialyse wurden die Elutionsfraktionen der HIC im Enzymtest auf RNase P-Aktivität getestet. Bei wiederholten HIC-Aufreinigungen wurde eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt, so dass auf die Mini-Dialyse zum Screening der Proben verzichtet werden konnte. Folglich wurden die bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten RNase P-aktiven Komponenten direkt einer präparativen Dialyse unterzogen.

Bei späteren Aufreinigungen konnte gezeigt werden, dass in der Elutionsstufe 5 (100 % Elutionspuffer ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ebenfalls geringe Mengen RNase P-Aktivität eluieren. Diese konnte zunächst aufgrund der starken Verdünnung nicht nachgewiesen werden. Erst nach dem Vereinigen und Ankonzentrieren von ≥ 4 Fraktionen konnte die RNase P-Aktivität in dieser Elutionsfraktion detektiert werden (Probenvolumen im Aktivitätstest: 1 - 2 μl).

Letztendlich gelang mit dem etablierten Protokoll der HIC als zweitem Aufreinigungsschritt die Abtrennung von drei nicht-RNase P-aktiven Fraktionen, welche bei 1 M, 0,8 M und bei 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten (Abb. 4.2).

Ergebnisse und Diskussion

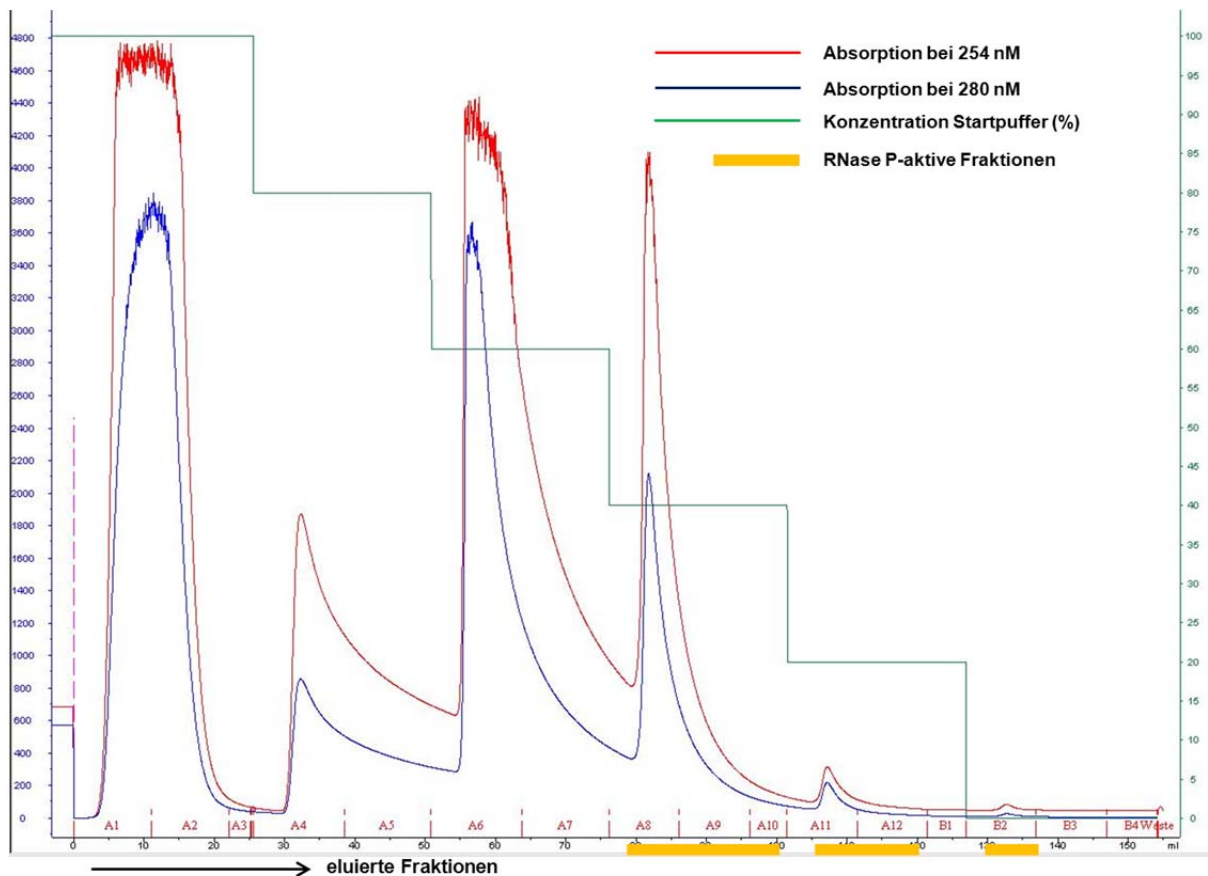


Abbildung 4.2: Repräsentatives Chromatogramm einer Hydrophoben Interaktions-Chromatographie (Phenyl-Sepharose Fast Flow). A1 - A3: Durchflussfraktionen (= *Flow through*). A4 - B4: fraktionierte Eluate. Die RNase P-aktiven Fraktionen eluierten in den Fraktionen A8 – B2 (gelb gekennzeichnet).

4.1.5 Größenausschluss-Chromatographie

4.1.5.1 Vorversuche zur Größenausschluss-Chromatographie

4.1.5.1.1 Ausschlussverfahren mittels Zentrifugations-Filtereinheiten

Um für die Größenausschluss-Chromatographie ein Chromatographiematerial mit einem geeigneten Trennbereich wählen zu können, wurden Vorversuche mit Zentrifugations-Filtereinheiten durchgeführt. Diese bestanden darin, RNase P-aktive Proben, welche zuvor mittels DEAE-Chromatographie und HIC aufgereinigt worden waren [(3.2.7.2.1), (3.2.7.2.2)], in Zentrifugations-Filtereinheiten mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen zu filtrieren und im Anschluss jeweils das Filtrat und den Filtrerrückstand auf RNase P-Aktivität zu testen. Insgesamt drei Aliquots einer RNase P-aktiven Probe, welche auf die oben beschriebene Weise vorgereinigt worden war, wurden in die Filtrationsgefäße überführt, deren Ausschlussgrenzen 10, 50 und 100 kDa betrugen. Nachdem die Probenausgangsvolumina um ca. die Hälfte reduziert worden waren, wurde mit je 5 µl von jedem Filtrat und mit je 3 µl von jedem Filtrerrückstand ein RNase P-Aktivitätstest durchgeführt (3.2.6.2). Das Ergebnis war, dass die Filtrate keine RNase P-aktiven Komponenten enthielten. Die RNase P-Aktivität wurde in jedem der drei Filtrerrückstände nachgewiesen. Folglich hat das funktionelle RNase P-Enzym im nativen Zustand ein Masse > 100 kDa. Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, dass es aus mehreren Komponenten besteht, welche einzeln ein Molekulargewicht < 100 kDa aufweisen. Beispielsweise setzen sich charakteristische bakterielle RNase P-Enzyme aus zwei Untereinheiten zusammen, einer großen RNA-

Untereinheit (100 – 130 kDa) und einer kleinen Proteinuntereinheit (13 – 14 kDa). Die Ergebnisse dieser Vorversuche wären mit der Existenz einer RNase P vereinbar, die eine typisch bakterielle Architektur besitzt, obgleich natürlich auch andere Enzymkomplex-Strukturen denkbar wären.

4.1.5.1.2 Test von Chromatographiematerialien für die Größenausschluss-Chromatographie

Durch die Vorversuche mit Zentrifugations-Filtereinheiten konnte gezeigt werden, dass die RNase P-Aktivität aus *A. aeolicus* eine Masse > 100 kDa besitzt. Daraufhin wurden drei Chromatographie-Matrizes für den dritten Aufreinigungsschritt getestet.

Superose 6-Säule

Zunächst wurde eine Größenausschluss-Chromatographie auf einer Superose 6-Säule durchgeführt. Das Material hat einen Trennbereich von 5 - 5000 kDa. Der anschließende Enzymtest der eluierten Fraktionen ergab, dass die RNase P-Aktivität auf der 24 ml-Säule getrennt vom Ausschlussvolumen nach dem 0,55 – 0,65-fachen Säulenvolumen eluierte.

Superose 12-Säule

Der Test mit einer Superose 12-Säule, welche einen Trennbereich von 1 – 300 kDa hat, ergab, dass die RNase P-aktiven Komponenten auf diesem Material nicht aufgetrennt werden konnten. Die RNase P-Aktivität wurde im Ausschlussvolumen nachgewiesen. Eine naheliegende Interpretation ist, dass die RNase P von *A. aeolicus* unter nativen Bedingungen eine Masse ≥ 300 kDa besitzt bzw. in einem größeren Komplex aus mehreren Untereinheiten vorliegt.

Superdex 200-Säule

Als dritte Chromatographie-Säule wurde eine Superdex 200-Säule getestet. Der Trennbereich dieses Chromatographie-Materials liegt zwischen 10 - 600 kDa. Die RNase P-aktiven Fraktionen eluierten bei Verwendung dieser Säule nicht im Ausschlussvolumen. Die Elution des gesuchten Enzyms erfolgte nach dem 0,45 - 0,55-fachen Säulenvolumen.

Für den dritten Aufreinigungsschritt wurde jedoch die Superose 6-Säule ausgewählt, da deren Trennleistung in den durchgeführten Vorversuchen besser war als die der Superdex 200-Säule.

4.1.5.1.3 Kalibrierung der Superose 6-Säule

Um das Molekulargewicht des RNase P-Enzyms aus *A. aeolicus* zu ermitteln, wurde die Superose 6-Säule mit Standardproteinen kalibriert (Abb. 4.3). Die Kalibrierung erfolgte bei 0,3 ml/min in Puffer A10 mit den Standardproteinen Cytochrom c, Carboanhydrase, Albumin, Alkohol-Dehydrogenase, β -Amylase und Apoferritin (Sigma Aldrich). Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Kalibrierung war sehr hoch. Die Elutionsvolumina der dreifach chromatographierten Standardproteine wichen maximal um 0,02 ml voneinander ab.

Kalibriergerade der Elutionsvolumina von Standardproteinen

Kalibrierung Superose 6-Säule

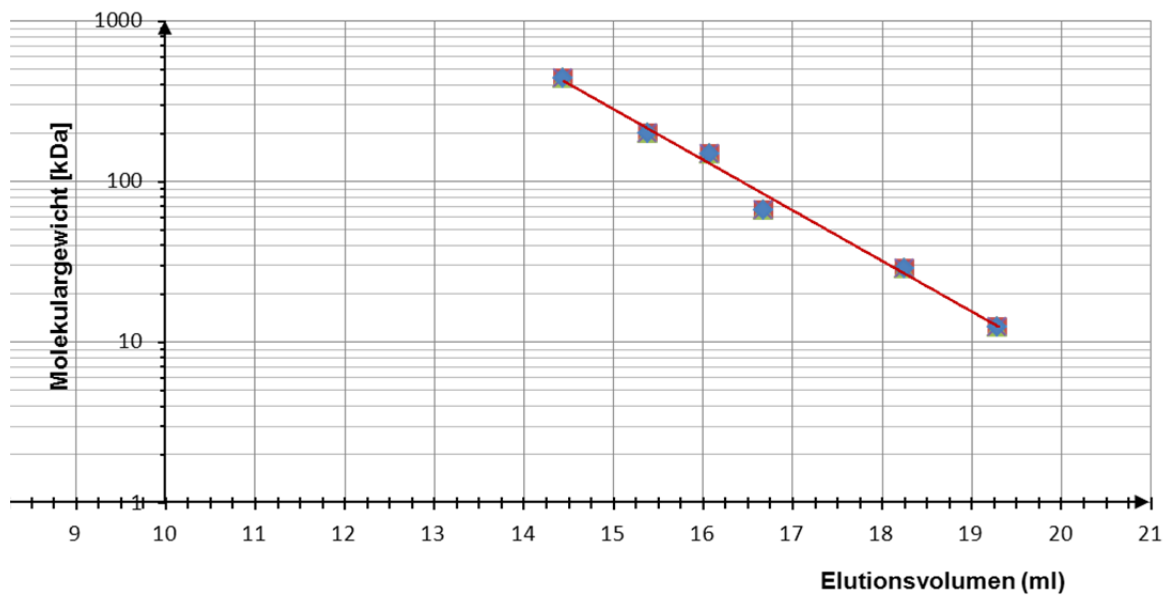


Abbildung 4.3: Elutionsvolumina von Standardproteinen auf einer Superose 6-Säule. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde das Molekulargewicht gegen das Elutionsvolumen aufgetragen.

4.1.5.1.4 Optimierung der Größenausschluss-Chromatographie

Die dialysierten *Pool*-Fraktionen aus HIC-Stufe 3 (Eluate bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und Stufe 4 (Eluate bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden im weiteren Verlauf der Aufreinigung entweder vereinigt oder separat auf die Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetragen. Dabei stellte sich heraus, dass eine bessere Auftrennung erfolgt, wenn die bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten HIC-Proben getrennt auf die Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetragen werden. Laut Herstellerangabe kann das Superose 6-Säulenmaterial geringe hydrophobe Wechselwirkungen mit der Probe eingehen. Folglich würden sich Fraktionen, die bei der vorangegangenen HIC-Aufreinigung bei unterschiedlichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen eluierten und demnach auch unterschiedliche hydrophobe Eigenschaften besitzen, auch auf der leicht hydrophoben Superose 6-Matrix im Elutionsverhalten voneinander unterscheiden. Auch bestand die Möglichkeit, dass es sich bei den bei 0,4 M und 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten RNase P-Aktivitäten um zwei Komplexe mit teilweise unterschiedlicher Zusammensetzung handelt. Ein Vereinigen der beiden HIC-Elutionsfraktionen vor der Größenausschluss-Chromatographie könnte zur Folge haben, dass sich die Elutionsprofile beider Fraktionen auf der Superose 6-Säulenmatrix partiell überlagern und es daher zu einer schlechteren Auftrennung der RNase P-aktiven Komponenten kommt. Es wäre auch möglich, dass bei der HIC-Aufreinigung aufgrund der hohen Salzkonzentrationen Wechselwirkungen zwischen (multiplen) Komponenten, die mit der RNase P-Aktivität assoziiert sind, aufgehoben wurden, was zu einer getrennten Elution der RNase P-Aktivität bei 0,4 M und 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ führte. Bei einer Vereinigung der beiden dialysierten Elutionsfraktionen vor der Größenausschluss-Chromatographie könnten diese unter den erneut niedrigen Salzkonzentrationen wieder interagieren, was eine schlechtere Auftrennung der einzelnen Komponenten zur Folge hätte.

Fortan wurden für die weitere Aufreinigung die bei unterschiedlichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen eluierten HIC-Fractionen separat auf die Superose 6-Säule geladen. Dabei konnte bei der Chromatographie von HIC-Eluaten, die im vorangegangenen Aufreinigungsschritt bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten, eine wesentlich bessere Auftrennung erzielt werden als bei der Chromatographie von HIC-Eluaten, die bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert worden waren. Auch hier könnte die Ursache für das unterschiedliche Auftrennungsvermögen eine unterschiedliche Zusammensetzung der RNase P-aktiven Komponente(n) sein. Ergebnisse der im späteren Verlauf durchgeführten massenspektrometrischen Analysen und RNA-Sequenzierungsdaten deuten ebenfalls auf multiple Komponenten hin, die mit der RNase P-Aktivität assoziiert sind.

Um eine bessere Auftrennung bei der Gelchromatographie von HIC-Fractionen zu erreichen, die bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluierten, wurde versucht, die Aufreinigung der Proben durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 1 mM im Elutionspuffer) zu verbessern. Eine Optimierung konnte damit aber nicht erreicht werden. Stattdessen führte eine Erhöhung der NH_4Cl -Konzentration im Elutionspuffer der Größenausschluss-Gelchromatographie von 60 mM auf 260 mM (= Puffer A260) zu einer besseren Trennleistung bei der Aufreinigung von HIC-Eluaten aus Stufe 3 (0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

4.1.5.2 Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 4-Eluaten

Bei der Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 4-Fractionen erstreckte sich die Elution RNase P-aktiver Komponenten auf ein Elutionsvolumen von 14 - 17 ml. Die höchste RNase P-Aktivität wurde in Superose 6-Fractionen nachgewiesen, die zwischen 14,5 ml und 15,5 ml eluierten (Abb. 4.4).

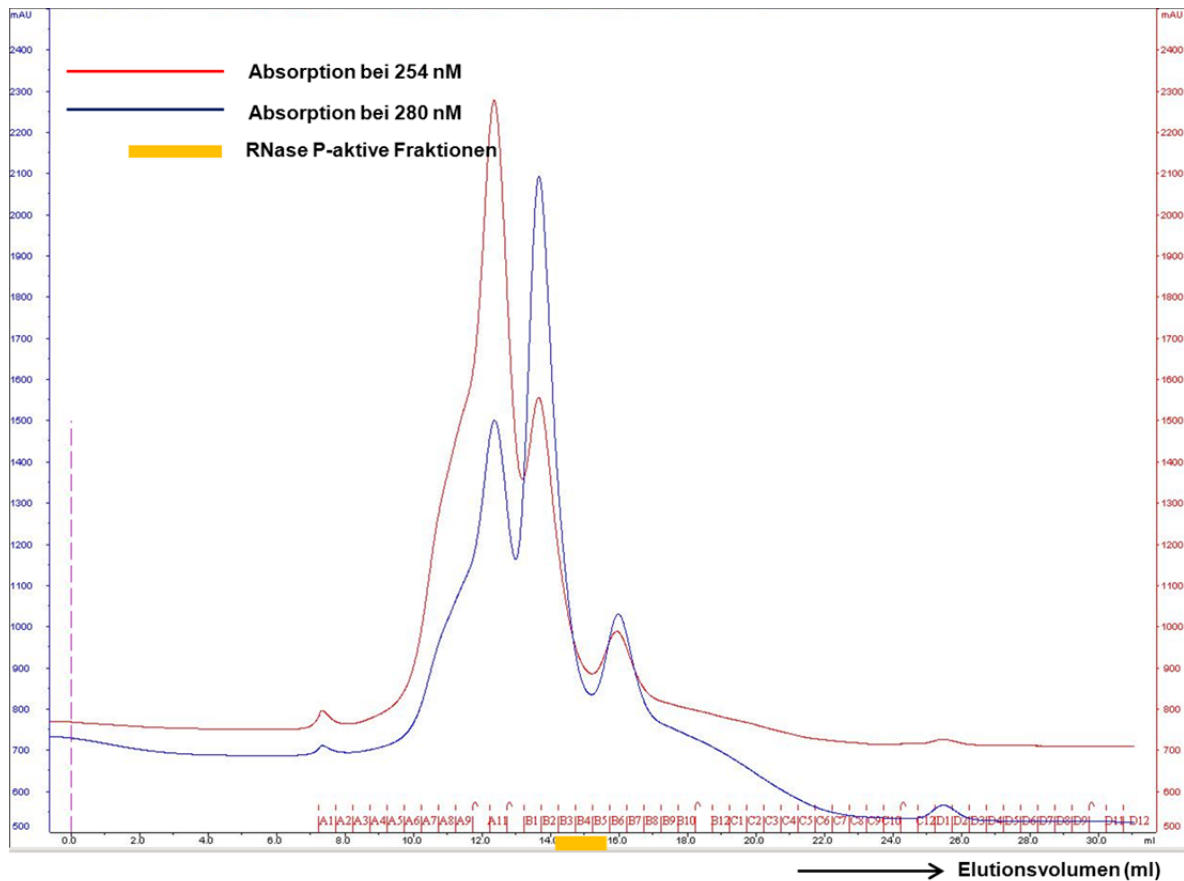


Abbildung 4.4: Repräsentatives Elutionsprofil einer Größenausschluss-Chromatographie. Auf die Superose 6-Säule wurde eine RNase P-aktive Fraktion aufgetragen, die bei der vorangegangenen HIC-Aufreinigung bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Stufe 4) eluierte. Die höchste RNase P-Aktivität wurde in den Fraktionen B3 – B5 nachgewiesen (gelb gekennzeichnet).

In Bezug auf die Kalibriergerade, die mit Standardproteinen für diese Säule erstellt wurde, entspricht die Masse der eluierten RNase P-aktiven Komponente(n) etwa 300 kDa. Es muss erwähnt werden, dass bei den anfangs durchgeführten Größenausschluss-Chromatographien eine Masse von ca. 400 kDa für die RNase P-Aktivität ermittelt wurde. Ein Grund für die Abweichung könnte sein, dass im Verlauf der Optimierung eine Verbesserung der Aufreinigung erzielt werden konnte und schwach oder unspezifisch assoziierte Komponenten erfolgreich abgetrennt wurden.

4.1.5.3 Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 3-Eluaten

Bei der Superose 6-Chromatographie von HIC Stufe 3-Fractionen erstreckte sich das Elutionsvolumen RNase P-aktiver Komponenten auf 13,5 - 16 ml. Trotz des geringeren Auftrennungsvermögens wurde auch hier die höchste RNase P-Aktivität in Fraktionen nachgewiesen, die zwischen 14,5 ml und 15,5 ml eluierten (Abb. 4.5).

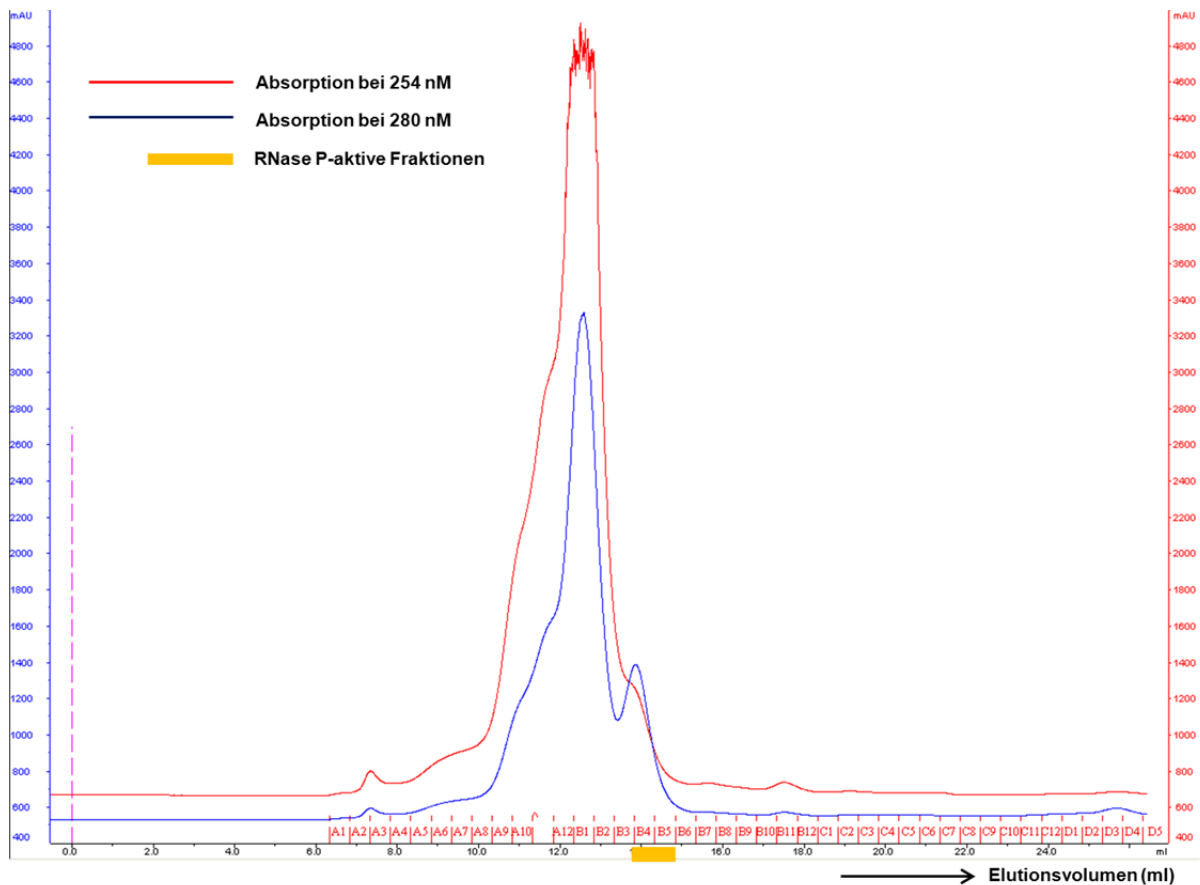


Abbildung 4.5: Repräsentatives Elutionsprofil einer Größenausschluss-Chromatographie. Auf die Superose 6-Säule wurde eine RNase P-aktive Fraktion aufgetragen, die in der vorhergehenden HIC-Aufreinigung bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Stufe 3) eluierte. Die höchste RNase P-Aktivität wurde in den Fraktionen B4 und B5 nachgewiesen (gelb gekennzeichnet).

Anhand des Elutionsvolumens der Fraktionen mit der höchsten RNase P-Aktivität und der experimentell ermittelten Kalibriergeraden (4.1.5.1.3) wurde eine Masse von ca. 400 kDa für die aus HIC Stufe 3-Eluaten aufgereinigte RNase P-Aktivität bestimmt. Im Vergleich zur Aufreinigung der Stufe 4-Eluate war die Auftrennung hier - wie bereits erwähnt - nicht sehr effizient. Möglicherweise an die RNase P assoziierte Komponenten könnten bei der Aufreinigung von HIC Stufe 3-Eluaten nicht vollständig abgetrennt worden sein. Dies könnte die Differenz von ca. 100 kDa (300 vs. 400 kDa) bei den ermittelten Molekulargewichten zwischen Größenausschluss-Aufreinigungen aus Stufe 3- und Stufe 4-Eluaten erklären.

4.1.6 RNA-Isolation aus aufgereinigtem *A. aeolicus* Lysat

Alle bisher charakterisierten Bakterien besitzen ein RNase P-Enzym, das aus einer katalytischen RNA-Untereinheit und einer kleinen Proteinuntereinheit aufgebaut ist. Bislang konnte jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die RNase P aus *A. aeolicus* eine essenzielle RNA-Komponente besitzt. Analysen mit standardmäßig präparierter RNA, beispielsweise Phenol/Chloroform-extrahierter Gesamt-RNA aus *A. aeolicus* (Willkomm *et al.* 2002) oder partiell (DEAE-) aufgereinigten Lysaten von *A. aeolicus* (Marszalkowski *et al.* 2008) lieferten keine eindeutigen Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine spezielle Methode zur Isolation von RNA aus *A. aeolicus* angewandt, die nicht auf Extraktion durch organische Lösungsmittel basiert.

Im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie sollten zunächst die Proteinkomponenten aus vorgereinigten *A. aeolicus*-Fraktionen für weitere Untersuchungen

Ergebnisse und Diskussion

(u.a. massenspektrometrische Analysen) isoliert werden. Die Protein-Präparation wurde anhand eines Protokolls zur Extraktion ribosomaler Proteine (Hartmann 1983) durchgeführt (3.2.7.3). Dabei wurde zunächst die Gesamt-RNA mittels Magnesiumacetat/Essigsäure gefällt. Vor dem Hintergrund, dass mit standardmäßig präparierter RNA aus *A. aeolicus* bisher kein Nachweis für eine essenzielle RNase P RNA-Komponente geführt werden konnte, war mittels Magnesiumacetat/Essigsäure-Fällung isolierte RNA für weitere Untersuchungen ein interessantes Ausgangsmaterial. Die gefällte RNA wurde nach Dialyseschritten wieder in nativem Puffer gelöst. Die nach der RNA-Fällung im Überstand verbliebene Proteinfraction wurde mittels Aceton gefällt und ebenfalls in mehreren Arbeitsschritten wieder in native Pufferbedingungen überführt.

Mit den auf diese Weise isolierten RNA- und Protein-Präparationen (3.2.7.3) aus *A. aeolicus* Zelllysat konnte dann in einem anschließenden Rekonstitutionsexperiment erstmalig ein konkreter Hinweis erbracht werden, dass eine RNA-Komponente für die *A. aeolicus* RNase P-Aktivität essenziell ist: Während durch die Kombination dieser RNA- und Proteinpräparationen *A. aeolicus* RNase P-Aktivität rekonstituiert werden konnte, zeigten die Einzelpräparationen (RNA oder Protein) keine Aktivität. Durch das Experiment konnte weiter gezeigt werden, dass das verwendete Protokoll zur Isolierung nativer RNA (und Proteine) aus *A. aeolicus* Lysat geeignet ist.

In einem daran anschließenden Versuch wurde die Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA vor der Vereinigung mit der Protein-Fraktion zusätzlich einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.2.2.1) unterzogen, um möglicherweise vorhandene restliche Proteine vollständig zu entfernen. Auch nach diesem zusätzlichen Extraktionsschritt konnte die RNase P-Aktivität nur durch Kombination von RNA- und Proteinfraction wiederhergestellt werden. Zwei Versuchsbedingungen waren wohl entscheidend für den Erfolg des Rekonstitutionsexperiments. Erstens konnte die RNA nur in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen effektiv extrahiert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass in der *A. aeolicus* RNase P eine starke Interaktion zwischen Protein und RNA vorliegt, die durch eine einfache Phenol/Chloroform-Extraktion nicht aufgelöst werden kann. Zweitens war sowohl die Magnesiumacetat/Essigsäure-Fällung der RNA-Fraktion als auch die Aceton-Fällung der Proteinfraction nur erfolgreich, wenn das jeweilige Probenmaterial als Konzentrat vorlag. Als Probenmaterial für die Rekonstitutionsversuche wurden mittels Gelchromatographie (Superose 6; 3.2.7.2.3) aufgereinigte Fraktionen verwendet, die im Aufreinigungsschritt zuvor (HIC; 3.2.7.2.2) bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eluiert worden waren. Eine effiziente Fällung der RNA- und Proteinfractionen fand demnach nur nach Ankonzentrierung der RNase P-aktiven Gelchromatographie-Fractionen mittels Zentrifugations-Filtereinheiten statt [Superose 6-gereinigte 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Elate: Ankonzentrierung um den Faktor 42 / Superose 6-gereinigte 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Elate: Ankonzentrierung um den Faktor 35]. Wurde die Ankonzentrierung im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie hingegen unterlassen, so gelang die Aceton-Fällung der Proteine überhaupt nicht, die Magnesiumacetat/Essigsäure-Fällung der RNA nur bedingt.

4.2 RNA-allein Reaktionen

Nachdem ein Hinweis vorlag, dass eine RNA-Komponente für die RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* essenziell sein könnte (4.1.6; 4.3; 4.4), wurden mit RNA-Präparationen aus *A. aeolicus* Lysaten Enzymtests unter sogenannten Hochsalzbedingungen (100 mM Mg^{2+}) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte für die RNA-Untereinheiten der RNase P aus *E. coli* und *B. subtilis* *in vitro* eine spezifische katalytische Aktivität (= RNA-allein Reaktion) nachgewiesen werden (Guerrier-Takada *et al.* 1983). Für die RNA-allein Reaktionen wurden partiell aufgereinigte RNase P-aktive Fraktionen verwendet (ankonzentrierte Superose 6-Eluat bzw. DEAE-Fraktionen), die entweder mit Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällt (3.2.7.3) oder Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1) worden waren. Die Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA ist dabei keiner zusätzlichen Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen und die Phenol/Chloroform-extrahierte RNA zuvor nicht mit hohen Ammoniumsulfat-Konzentrationen behandelt worden. Parallel wurde ein Ansatz mit *E. coli* P RNA unter den gleichen Reaktionsbedingungen getestet. Die RNA-allein Reaktion wurde in Puffer A0 bei 100 mM $Mg(OAc)_2$ durchgeführt. Die Konzentration der getesteten Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällten RNA im Prozessierungsansatz war 0,15 $\mu g/\mu l$, die der partiell aufgereinigten Phenol/Chloroform-extrahierten RNA 0,11 $\mu g/\mu l$ und die der *E. coli* P RNA 0,15 μM . Die RNAs wurden abweichend vom Standard-Protokoll für Enzymtests (3.2.6.2) für 10 min bei 55 °C und anschließend 40 min bei 37 °C präinkubiert. Bei den Enzymtests mit den beiden RNA-Präparationen aus *A. aeolicus* konnte nach einer Inkubationszeit von einer Stunde keine RNase P-Aktivität detektiert werden. In dem als Positivkontrolle durchgeführten Enzymtest mit *E. coli* P RNA hingegen konnte Prä-tRNA-Prozessierungsaktivität eindeutig nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

RNase P-Enzyme aus Archaea und Eukarya haben im Vergleich zum bakteriellen RNase P Enzym einen höheren Proteinanteil (Cho *et al.* 2010), (Jarrous and Gopalan 2010). Zeitgleich kann bei höherem Proteinanteil in den meisten Fällen eine strukturelle Reduktion der RNA-Untereinheit beobachtet werden (Marvin and Engelke 2009). Diese reduzierten RNase P RNA-Untereinheiten weisen häufig nur unter extremen Ionen-Bedingungen noch eine schwache katalytische Restaktivität auf (Pannucci *et al.* 1999). Es ist denkbar, dass die *A. aeolicus* RNase P im Vergleich zu den Bakterien-typischen RNase P-Enzymen ebenfalls einen höheren Proteinanteil aufweist und entsprechend extremere Ionenbedingungen – die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht getestet werden konnten - zur Regenerierung der katalytischen Aktivität erforderlich wären. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die RNase P aus *A. aeolicus* keine katalytische RNA-Untereinheit besitzt. Eine essenzielle RNA-Komponente könnte in diesem Fall andere, nicht-katalytische Funktionen bei diesem Enzym ausüben (z.B. Substratrekrutierung oder als Strukturgerüst zur Assemblierung multipler Proteinkomponenten).

4.3 Rekonstitution von *A. aeolicus* RNase P aus RNA- und Protein-Komponenten

In dieser Arbeit konnte erstmals RNase P-Aktivität in rekonstituierten Holoenzymen von *A. aeolicus* nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit partiell vorgereinigten RNA- und Protein-Präparationen (3.2.7.3) geführt.

Nachdem in Vorexperimenten die Rekonstitution von RNase P-aktiven Holoenzymen aus Aceton-gefällter Protein-Fraktion und Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällter RNA-Fraktion

Ergebnisse und Diskussion

gelingen war (3.2.6.5.1), wurde die Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA vor den Rekonstitutionsversuchen zusätzlich Phenol/Chloroform-extrahiert, um eventuell vorhandene restliche Proteinkontaminationen vollständig abzutrennen. Für die Holoenzym-Rekonstitution wurden die RNA-Fraktion und Protein-Fraktion in einem Reaktionsansatz vereinigt und auf RNase P-Aktivität getestet (3.2.6.5.2). Die Experimente wurden mit RNA- und Protein-Komponenten durchgeführt, die entweder aus Eluat-Fraktionen des 2. Aufreinigungsschrittes (Hydrophobe Interaktions-Chromatographie [HIC]) oder des 3. Aufreinigungsschrittes (Größenausschluss-Chromatographie [GAC]) aufbereitet worden waren. Durch Anlegen eines Stufengradienten mit absteigenden Konzentrationen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnten insgesamt 5 Elutionsfraktionen von der HIC-Aufreinigung erhalten werden (4.1.4.2). Die RNase P-Aktivität eluierte nahezu vollständig in zwei separaten Fraktionen, wobei eine Fraktion bei Stufe 3 [Elution bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] eluierte und die andere Fraktion bei Stufe 4 [Elution bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Die RNase P-aktiven Elutionsfraktionen dieser beiden Stufen wurden im Anschluss nochmals separat auf einer Superose 6-Größenausschluss-Chromatographie-Säule aufgetrennt (4.1.5.1.4). Aus den verschiedenen Elutionsfraktionen wurden, wie eingangs beschrieben, jeweils die RNA- und Protein-Komponenten für die Rekonstitutionsexperimente präpariert. Als Kontrolle wurden zusätzlich die entsprechenden Komponenten aus HIC-Eluaten der RNase P-inaktiven Stufe 2 [Elution bei 0,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] präpariert. Die extrahierten *A. aeolicus* RNA-Fraktionen wurden im Enzymtest in Endkonzentrationen von 20 – 30 ng/μl und die Aceton-gefällten *A. aeolicus* Protein-Fraktionen in Endkonzentrationen von 40 – 60 ng/μl eingesetzt. Für jede zu analysierende Aufreinigungsfraction wurden drei Enzymtests angesetzt: [1] ein Ansatz mit vereinigter RNA- und Protein-Präparation zur Holoenzym-Rekonstitution (HE); [2] ein Ansatz mit der RNA-Präparation (R) und [3] ein Ansatz mit der Protein-Präparation (P). Als Positivkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit dem Holoenzym von *B. subtilis* (Endkonzentration im Enzymtest: 6,4 nM). In einer weiteren Kontrolle wurde parallel die Aktivität der *B. subtilis* P RNA (PR) (Endkonzentration im Enzymtest: 8 nM) bestimmt.

Ein repräsentatives Ergebnis der Rekonstitutionsexperimente ist in Abbildung 4.6 gezeigt. Für die analysierten Zelllysate, aus denen die RNA- und Protein-Komponenten präpariert wurden, ist die entsprechende Elutionsstufe der HIC-Aufreinigung und der Aufreinigungsgrad angegeben. Der Aufreinigungsgrad zeigt an, welche Aufreinigungsschritte das jeweilige Zelllysate insgesamt durchlaufen hat. SA und SB sind Aliquots aus den Substrat-Mixen für die *A. aeolicus* Rekonstitutionsexperimente bzw. *B. subtilis* Positivkontrolle, die nicht mit RNase P-aktiven Komponenten inkubiert wurden.

Ergebnisse und Diskussion

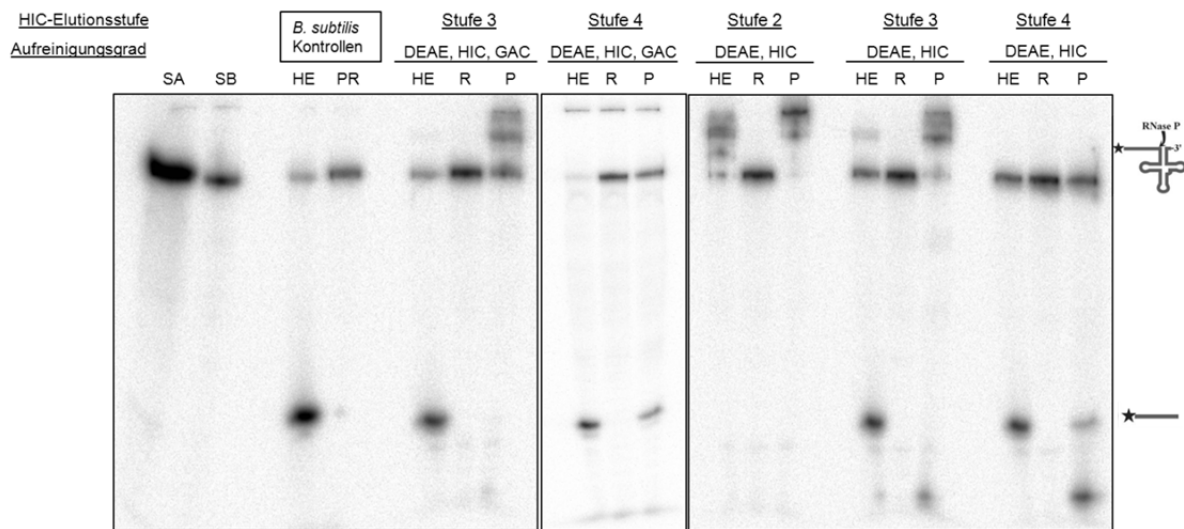


Abbildung 4.6: Rekonstitution von RNase P-aktiven Holoenzymen (HE) aus extrahierten *A. aeolicus* RNA (R)- und Protein (P)-Präparationen unterschiedlicher Aufreinigungsgrade (DEAE: Anionenaustausch-Chromatographie. HIC: Hydrophobe Interaktions-Chromatographie. GAC: Größenausschluss-Chromatographie). Zusätzlich wurden die *A. aeolicus* RNA-Präparationen und Protein-Präparationen allein auf RNase P-Aktivität getestet. Die Stufen 2 – 4 geben an, bei welcher HIC-Elutionsstufe die verwendeten *A. aeolicus*-Fraktionen eluierten. Das *B. subtilis* Holoenzym wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Als zusätzliche Kontrolle wurde *B. subtilis* RNase P RNA allein mit dem Substrat unter identischen Bedingungen inkubiert (PR). Aliquots aus den Substrat-Mixen für die *A. aeolicus*- (SA) und *B. subtilis*- (SB) Reaktionsansätze dienten als Negativ-Kontrollen. Die Inkubation erfolgte in 1x Puffer A0 mit 4,5 mM Mg^{2+} für 15 - 30 min.

Die Rekonstitution von RNase P-aktiven Holoenzymen durch Kombination von RNA- und Proteinpräparationen aus aufgereinigten Zelllysaten bringt den erstmaligen Nachweis für die Beteiligung sowohl einer RNA- als auch einer Protein-Komponente an der RNase P-Aktivität in *A. aeolicus*. RNase P-Aktivität konnte bei Holoenzymen nachgewiesen werden, die aus RNA- und Protein-Proben sowohl der HIC-Aufreinigung (Elutionsstufe 3 und 4) als auch der entsprechenden Größenausschluss-Chromatographie rekonstituiert wurden. Bei der Vereinigung von RNA- und Protein-Proben aus Eluaten der RNase P-inaktiven HIC-Stufe 2 hingegen konnte keine RNase P-Aktivität gemessen werden. Wurden die präparierten RNA- und Protein-Komponenten getrennt voneinander getestet, so konnte in diesen Reaktionsansätzen - mit einer Ausnahme - ebenfalls keine RNase P-Aktivität detektiert werden. Die Beobachtung, dass die auf HIC Stufe 4-Fractionen basierenden Protein-Proben eine schwache RNase P-Aktivität aufwiesen, könnte durch eine unvollständige Abtrennung der RNA-Komponenten während der Fällung bzw. Extraktion erklärt werden. Solch eine Protein-allein Reaktion wurde reproduzierbar bei den aus Stufe 3-Elutionsfraktionen aufbereiteten Protein-Proben nicht beobachtet. Im Hinblick auf eine mögliche RNA-Kontamination wurde das RNA : Protein Verhältnis in den einzelnen Proben der Aceton-gefällten Proteine mittels photometrischer Messung bestimmt. Während das Verhältnis für Protein-Proben aus Stufe 3-Fractionen bei $A_{260} : A_{280} = 0,9 - 1$ lag, war es bei Stufe 4-Fractionen auf $0,5 - 0,6$ erniedrigt. Folglich unterschieden sich die Protein-Proben der verschiedenen HIC-Elutionsfraktionen in Bezug auf das RNA : Protein Verhältnis voneinander. Entgegen den Überlegungen enthalten die aus Stufe 4-Eluaten präparierten Proteine jedoch einen geringeren Anteil an Nukleinsäuren als die aus Stufe 3-Eluaten präparierten Proteine. Über die Identität der Nukleinsäuren können jedoch keine Angaben gemacht werden. Wie unter 4.1.6 diskutiert, gibt es experimentelle Hinweise, dass die RNA-Protein-Interaktion in der *A. aeolicus* RNase P relativ stark ist. So besteht die Möglichkeit, dass der RNase P-Ribonukleoproteinkomplex in den bei Stufe 4 von der HIC-Säule eluierten

Fraktionen und der anschließenden Aceton-Fällung nicht vollständig aufgetrennt werden konnte. In diesem Fall könnte eine Protein-allein Aktivität vorgetäuscht werden.

Es wurden zusätzliche Holoenzym-Rekonstitutionsversuche mit RNA-Proben vorgenommen, die direkt aus DEAE-Fraktionen Phenol/Chloroform-extrahiert wurden. In diesem Fall war die RNA weder mit hohen Konzentrationen Ammoniumsulfat noch mit Magnesiumacetat/Essigsäure behandelt worden. Die nach dieser Methode präparierte RNA (Endkonzentration im Prä-tRNA-Prozessierungsansatz: 100 ng/μl) wurde mit Aceton-gefälltem Protein (Endkonzentration im Prozessierungsansatz: 300 ng/μl) vereinigt und auf RNase P-Aktivität hin untersucht. Der Enzymtest fiel negativ aus. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass die RNA-Komponente der *A. aeolicus* RNase P nur in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen effektiv extrahiert werden kann (4.1.6). Eventuell gelingt während einer einfachen Phenol/Chloroform-Behandlung keine effektive Abtrennung der RNase P Proteine von der RNA-Komponente und es kommt bei den Phasentrennungen zu einem Verlust der Ribonukleoproteinkomplexe.

4.3.1 Heterologe Rekonstitutionen von *A. aeolicus* RNase P

Neben der homologen Rekonstitution von RNase P-aktiven Holoenzymen aus RNA- und Protein-Komponenten von *A. aeolicus* (4.3) wurden auch heterologe Rekonstitutionsversuche durchgeführt. Dadurch wurde indirekt auch getestet, ob es sich bei der *A. aeolicus* RNase P um ein klassisches bakterielles RNase P-Enzym handelt. Bei diesen Versuchen wurden entweder *A. aeolicus* RNA-Komponenten mit dem *B. subtilis* P Protein oder *B. subtilis* P RNA mit *A. aeolicus* Protein-Komponenten vereinigt und auf RNase P-Aktivität getestet.

In solch einem Experiment wurde Magnesiumacetat/Essigsäure-gefällte RNA von *A. aeolicus* aus einer HIC-Elutionsfraktion (Endkonzentration im Ansatz: 90 ng/μl) mit dem P Protein von *B. subtilis* (Endkonzentration im Ansatz: 340 nM) kombiniert. Die hierbei verwendete RNA-Probe war nicht zusätzlich Phenol/Chloroform-extrahiert worden, aber die Rekonstitution von homologen RNase P-aktiven Holoenzymen mit *A. aeolicus* Protein-Komponenten war mit dieser RNA bereits erfolgreich gewesen. Nach der heterologen Rekonstitution dieser RNA mit dem *B. subtilis* P Protein konnte im anschließenden Enzymtest jedoch keine RNase P-Aktivität detektiert werden.

In einem weiteren Rekonstitutionsansatz wurde Phenol/Chloroform-extrahierte RNA von *A. aeolicus* aus einer RNase P-aktiven DEAE-Elutionsfraktion (Endkonzentration im Ansatz: 90 ng/μl) mit dem *B. subtilis* P Protein (Endkonzentration im Ansatz: 340 nM) kombiniert. Die für diesen Versuch verwendete RNA-Probe war nicht mit hohen Salzkonzentrationen ((NH₄)₂SO₄ oder Mg(OAc)₂/CH₃COOH) behandelt worden. Jedoch konnte mit dieser RNA-Fraktion weder ein homologes noch ein heterologes Enzym mit messbarer RNase P-Aktivität rekonstituiert werden.

Durch die Kombination der *B. subtilis* P RNA (Endkonzentration im Ansatz: 20 nM) mit Aceton-gefälltem Protein aus einer RNase P-aktiven HIC-Elutionsfraktion (Endkonzentration im Ansatz: 300 ng/μl) konnte ebenfalls keine RNase P-Aktivität rekonstituiert werden, obwohl mit der verwendeten *A. aeolicus* Protein-Komponente die Rekonstitution homologer RNase P-aktiver Holoenzyme erfolgreich gewesen war.

Die konservierte Funktion bakterieller RNase P Proteine und RNAs konnte in heterologen Komplementationsstudien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden (Guerrier-Takada *et al.* 1983), (Waugh and Pace 1990), (Wegscheid *et al.* 2006), (Gößringer and

Hartmann 2007). Folglich deuten die Ergebnisse der hier durchgeführten heterologen Rekonstitutionsversuche darauf hin, dass es sich bei der RNase P-Aktivität aus *A. aeolicus* um kein konventionelles bakterielles RNase P-Enzym handelt. Diese Interpretation wird dadurch gestützt, dass trotz intensiver bioinformatischer Analyse des Genoms von *A. aeolicus* kein Gen für eine bakterielle P RNA oder ein bakterielles P Protein identifiziert werden konnte (Hartmann and Hartmann 2003), (Li and Altman 2004a), ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4).

4.4 Micrococcal Nuclease-Behandlung RNase P-aktiver *A. aeolicus*-Fraktionen

In dieser Arbeit konnte erstmals der eindeutige Nachweis geführt werden, dass eine RNA-Komponente essenziell für die RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* ist. Das hier durchgeführte Experiment zeigt, dass durch Inkubation einer partiell aufgereinigten RNase P-aktiven Fraktion aus *A. aeolicus* mit Micrococcal Nuclease (MN) die RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* aufgehoben wird.

Für den Nachweis wurde eine partiell aufgereinigte Fraktion von *A. aeolicus* mit der Ca^{2+} -abhängigen MN in Gegenwart von Ca^{2+} inkubiert. Anschließend wurde die katalytische Aktivität der MN durch Zugabe des Komplexbildners Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) inhibiert, um einen Abbau des RNA-Substrats im anschließenden RNase P-Aktivitätstest zu verhindern. EGTA komplexiert zweiwertige Kationen und weist dabei eine bedeutend höhere Affinität zu Ca^{2+} - als zu Mg^{2+} -Ionen auf. Diese Eigenschaft ist für den durchgeführten Enzymtest von Vorteil, da die Aktivität aller bekannten RNase P-Enzyme Mg^{2+} -abhängig ist. Nach der MN-Inhibition durch Komplexierung des Cofaktors Ca^{2+} wurde ein RNase P-Aktivitäts-Test durchgeführt. Dem Testansatz war zusätzlich Träger-RNA (6S-1 RNA) im 500-fachen Überschuss hinzugefügt worden. Dadurch wurde verhindert, dass die katalytisch inaktivierte MN durch Bindung an das Substrat die RNase P-Schnittstelle an der Prä-tRNA blockiert (Wang and Gegenheimer 1990). Eine sterische Blockade der RNase P-Schnittstelle durch die MN kann zu einer Reduktion bzw. vollständigen Inhibition der Prä-tRNA-Prozessierung durch die RNase P führen. Dieser als „Substratmaskierung“ bezeichnete Vorgang (Wang and Gegenheimer 1990) kann zu Fehlinterpretationen bei MN-Inkubationstests führen. Durch die Zugabe von Träger-RNA im 500-fachen Überschuss zum RNase P-Substrat wird eine Substrat-Maskierung verhindert, da die RNA-Bindestellen der MN durch Träger-RNA abgesättigt werden.

Ergebnisse und Diskussion

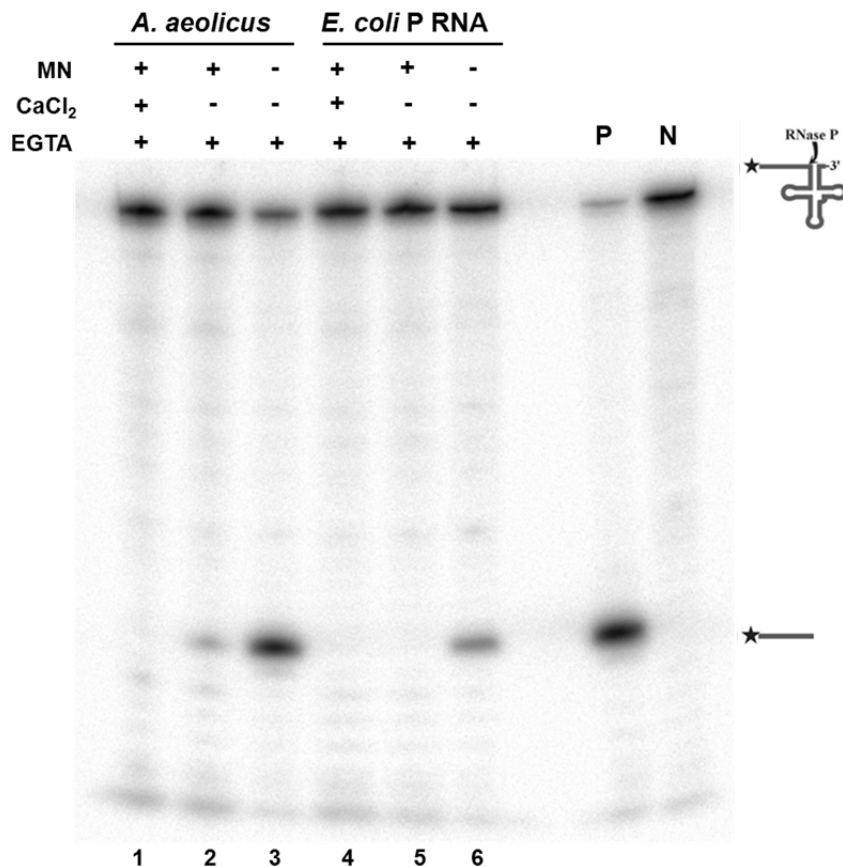


Abbildung 4.7: Enzymtest mit je 10 μ l partiell aufgereinigten Fraktionen von *A. aeolicus* oder 6,5 pmol *E. coli* RNase P RNA nach Micrococcal Nuclease (MN)-Behandlung bzw. ohne MN-Behandlung. Die RNase P-Aktivität wurde in Gegenwart bzw. Abwesenheit des MN-Cofaktors Ca²⁺ mit *T. thermophilus* Prä-tRNA^{Gly} als Substrat analysiert. Dem Reaktionsansatz wurde Träger-RNA im 500-fachen molaren Überschuss hinzugefügt, um eine Substrat-Maskierung zu verhindern (3.2.4.8). Die Inkubation erfolgte in 1x Puffer A0 mit 10 mM Mg²⁺ für jeweils 30 min bei 37°C (3.2.6.2). Positivkontrolle (P): *E. coli* P RNA; Negativkontrolle (N): Substrat ohne Zugabe von Enzymaktivität.

Die bei der MN-Behandlung verwendete *A. aeolicus*-Fraktion wurde zuvor partiell aufgereinigt. Hierzu wurde eine RNase P-aktive DEAE-Fraktion von *A. aeolicus* mit 2 M (NH₄)₂SO₄ gefällt. Die RNase P-aktive Überstand-Fraktion wurde anschließend über einer Octyl Sepharose-Säule aufgereinigt. Mit weiteren *A. aeolicus*-Fraktionen, die im Vorfeld mit \geq 1 M (NH₄)₂SO₄ behandelt worden waren, konnten im Enzymtest nach MN-Behandlung vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Bei Inkubation der *A. aeolicus*-Fraktion bzw. *E. coli* P RNA mit MN in Gegenwart von Ca²⁺ (Spur 1 bzw. 4) konnte keine RNase P-Aktivität mehr detektiert werden. Wurde die MN-Behandlung in Abwesenheit des MN-Cofaktors Ca²⁺ durchgeführt, so konnte bei der partiell gereinigten Fraktion von *A. aeolicus* noch eine schwache Aktivität beobachtet werden (Spur 2) und beim Enzymtest mit der *E. coli* P RNA war entsprechend der geringeren Aktivität der *E. coli* P RNA im Vergleich zur partiell gereinigten *A. aeolicus*-Fraktion (Spur 6 vs. 3) unter diesen Bedingungen keine RNase P-Aktivität mehr nachweisbar (Spur 5). Da EGTA zu jedem Ansatz hinzugefügt worden war, kann es sein, dass durch den EGTA-Zusatz nach der MN-Behandlung eventuell auch Mg²⁺-Ionen komplexiert wurden, so dass die Konzentration an freien Mg²⁺-Ionen im Reaktionsansatz für eine effektive katalytische Aktivität der RNase P bzw. RNase P RNA zu niedrig war.

Die Enzymtests mit MN-behandelten *A. aeolicus*-Fraktionen lieferten einen eindeutigen Beweis, dass eine RNA-Komponente eine wichtige Funktion bei der RNase P aus *A.*

aeolicus ausübt. Im Vergleich zu (Lombo and Kaberdin 2008) konnte dieser Nachweis zweifelsfrei anhand spezifischer RNase P-Aktivität geführt werden.

Ein entsprechender Versuch zur Untersuchung der Beteiligung einer Protein-Untereinheit an der RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* bestünde in einem Protease-Verdau mit anschließendem Test auf RNase P-Aktivität. Da Proteasen für ihre Aktivität aber SDS benötigen, bliebe unklar, ob eine ausbleibende RNase P-Aktivität nach einem Protease-Verdau auf den Verdau einer RNase P-aktiven Protein-Untereinheit zurückzuführen ist, oder auf eine enzymaktivitätsmindernde Wirkung des SDS.

4.4.1 Rescue Experiment: Regeneration der *A. aeolicus* RNase P-Aktivität nach Micrococcal Nuclease-Behandlung

Für diesen Versuch wurden zunächst aus RNase P-aktiven Fraktionen, die mittels DEAE- und Hydrophober Interaktions-Chromatographie aufgereinigt worden waren, die RNA- und Proteinkomponenten nach (3.2.7.3) präpariert (die RNA-Präparation wurde im Anschluss an die Magnesiumacetat/Essigsäure-Fällung jedoch nicht zusätzlich Phenol/Chloroform-extrahiert). In einem Enzymtest konnte in den voneinander getrennten Präparationen jeweils keine RNase P-Aktivität mehr detektiert werden, während sich durch Kombination der beiden Präparationen RNase P-Aktivität rekonstituieren ließ (3.2.6.5.1). Zur Degradation der RNA wurde das rekonstituierte Holoenzym nun mit Micrococcal Nuclease inkubiert (3.2.4.9). Ein anschließender Enzymtest bestätigte den Verlust der RNase P-Aktivität. Durch erneute Zugabe der RNA-Präparation (= „Rescue RNA“) konnte die RNase P-Aktivität wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Beim Entwurf des *Rescue*-Experiments wurde die homologe Rekonstitutionsanalyse (3.2.6.5) mit der Micrococcal Nuclease-Analyse (3.2.4.8) kombiniert. Das Ergebnis dieses Experiments validiert zusätzlich die Ergebnisse aus den jeweiligen Einzelanalysen (4.3, 4.4), die ebenfalls die Beteiligung einer essenziellen RNA-Komponente an der RNase P-Aktivität von *A. aeolicus* nahelegten.

4.5 RNA-Seq-Analysen

4.5.1 Sequenzierte Proben

Das Ziel der RNA-Analyse bestand darin, eine mögliche RNase P RNA von *A. aeolicus* zu identifizieren. Zur RNA-Analyse wurden zwei RNA-Proben (Probe A und Probe B) sequenziert, welche nach Methode 3.2.7.3 gewonnen und anschließend Phenol/Chloroform-extrahiert worden waren. Mit beiden RNA-Proben war RNase P-Aktivität in rekonstituierten Holoenzym-Ansätzen nachgewiesen worden (siehe 3.2.6.5). Probe A war im Vorfeld mittels Anionenaustausch-Chromatographie (4.1.2) und Hydrophober Interaktions-Chromatographie (3.2.7.2.2) aufgereinigt worden. Es handelte sich bei dieser Probe um HIC-Fraktionen aus der Optimierungsphase der hydrophoben Chromatographie, die bei 0,6 M Ammoniumsulfat im Elutionspuffer eluiert waren und RNase P-Aktivität aufwiesen (siehe auch 4.1.4.2). Im Vergleich zu Fraktionen, die bei 0,4 M und 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ der HIC eluierten, war die RNase P-Aktivität jedoch geringer. Probe B war im Vorfeld mittels DEAE- und hydrophober Chromatographie aufgereinigt worden. Anschließend war Probe B, die aus RNase P-aktiven Fraktionen der HIC-Stufe 3 (0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gewonnen worden war, mittels Größenausschluss-Chromatographie 3.2.7.2.3) aufgereinigt worden.

4.5.2 Sequenzierung und Analyse-Parameter

Beide RNA-Proben wurden mittels Illumina-Sequenzierung (Solexa), einer Methode zur Hochdurchsatz-Sequenzierung, sequenziert und in Kooperation mit Dr. Marcus Lechner (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) ausgewertet. Zur Auswertung wurde ein weiterer Datensatz mit einbezogen. Bei dem dritten Datensatz handelte es sich um die Sequenzierungsdaten von Gesamt-RNA aus *A. aeolicus*, welche für eine Transkriptomanalyse erstellt wurden. Von der genannten Gesamt-RNA gab es zwei cDNA-Bibliotheken, von denen eine auf Primärtranskripte angereichert worden war und die andere nicht (siehe Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)). Die Sequenzierungsdaten der nicht angereicherten Bibliothek wurden als Basiswerte der Transkriptions-Aktivität bewertet, die Daten der auf Primärtranskripte angereicherten Bibliothek wurden hier nicht weiter berücksichtigt. Bezüglich der RNase P-Aktivität wurde die Probe A als "partiell aufgereinigt" und jene der Probe B als "stark angereichert" klassifiziert. Bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten wurden zunächst Poly(A)-Sequenzen entfernt, die zur Erstellung der cDNA-Bibliothek im Vorfeld angefügt worden waren. Die Daten wurden mit `segemehl` (Otto *et al.* 2011) auf das Genom von *A. aeolicus* VF5 uid57765 [NC_000918, NC_001880] (NCBI-Resource-Coordinators 2014) kartiert. Dabei wurden Standardparameter verwendet, mit der Ausnahme, dass nur Sequenzierungsreads mit einer Länge bis zu acht Nukleotiden berücksichtigt wurden. Für die Analyse zur Anreicherung von Sequenzierungsreads wurden nur Positionen mit mehr als zehn Reads und 150 Nt „Coverage“ (lückenlose Abdeckung) in den Proben A und B berücksichtigt, ribosomale RNAs wurden ausgeklammert. Sequenzierungsreads wurden als angereichert bewertet, wenn sie in den Sequenzierungsdaten von Probe B (RNase P stark angereichert) „signifikant“ höher vertreten waren als in den Daten von Probe A (RNase P partiell aufgereinigt) oder in den Basisdaten. Dabei wurde „signifikant“ so definiert, dass die Differenz der Anzahl von Sequenzierungsreads über dem Median aller Differenzen von Bereichen mit mehr als zehn Reads und 150 Nt Länge liegt.

Die Ergebnisse wurden mit in R (R-CoreTeam 2013) erstellten Boxplots visualisiert. RNA Faltungsvorhersagen wurden mit `RNAfold` durchgeführt, wobei Standardparameter angewandt wurden (Lorenz *et al.* 2011). Homologe wurden mittels `NCBI BLAST+` (Camacho *et al.* 2009) und einem E-Value Schwellenwert von 1e-02 gesucht.

4.5.3 Ergebnisse der RNA-Analyse

Als Ergebnis der oben beschriebenen Analyse (4.5.2) wurden folgende sechs RNAs herausgefiltert, die im Anhang (7.5) jeweils detaillierter beschrieben sind:

RNA	Länge (nt)	Strang	Position
n4	300	+	38975 - 39274
n32	203	+	372922 - 373124
6S RNA	226	+	1219678 - 1219903
unk1	187	+	144716 - 144902
unk2	155	+	347468 - 347623
unk3	154	-	489842 - 489995

Tabelle 4.1: Auswertung von RNA-Sequenzierungsdaten von *A. aeolicus*-Fraktionen. Die Fraktionen waren partiell aufgereinigt und auf RNase P angereichert worden. n4 und n32: nicht-kodierende RNAs, welche auch in einer Transkriptom-Analyse von *A. aeolicus* identifiziert wurden, siehe auch Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck). unk: *unknown* RNA. Weitere Details zu jeder der gelisteten RNAs sind im Anhang aufgeführt (Deep Sequencing (RNA-Seq)-Datenauswertung 7.5). Die Positionsangaben beziehen sich auf Chromosom NC_000918 (*A. aeolicus*).

Die nicht-kodierenden RNAs „n4“ und „n32“ sind im Rahmen einer intensiven Transkriptom-Analyse von *A. aeolicus* bereits identifiziert worden, ihre Funktion ist unbekannt ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe auch Anhang 7.4). Auch über die Funktion der RNAs „unk1“ - „unk3“ (unk = unknown) ist noch nichts bekannt. 6S RNAs sind in Bakterien an der Transkriptionsregulation beteiligt. Ihre Struktur gleicht der eines offenen DNA-Promotors während der Transkriptionsinitiation (Trotchaud and Wassarman 2005), (Barrick *et al.* 2005), (Willkomm and Hartmann 2005). Durch Bindung der RNA-Polymerase an die 6S RNA wird in *E. coli* die Transkription an bestimmten DNA-Promotoren beim Übergang der Zellen in die stationäre Phase stark reduziert (Willkomm and Hartmann 2005), (Wassarman 2007). Die 6S RNA von *A. aeolicus* wurde im Rahmen einer RNomics-Studie identifiziert (Willkomm *et al.* 2005).

Das Ziel der RNA-Analyse bestand darin, eine mögliche RNase P RNA von *A. aeolicus* zu identifizieren. Dazu wurden unter anderem Strukturvergleiche gemacht. Für jede RNA, die bei der vergleichenden Analyse der Probanden A/B herausgefiltert worden war (siehe Tabelle 4.1), wurde eine Faltungsvorhersage mittels *RNAfold* vorgenommen (siehe auch Anhang 7.5). Die resultierenden Sekundärstrukturen wurden mit repräsentativen Sekundärstrukturen typischer bakterieller P RNAs verglichen. Dabei konnte keine nennenswerte Ähnlichkeit festgestellt werden. Auch die Länge der RNAs, die aus den Sequenzierungsdaten herausgefiltert wurden, entspricht nicht der einer klassischen bakteriellen P RNA. Typische P RNAs von Bakterien sind etwa 350 – 450 Nt lang. Die Längen der RNAs, die aus der Analyse der Sequenzierungsdaten resultieren, liegen zwischen 150 und 300 Nt. Allerdings muss bei der Suche nach Übereinstimmungen zwischen den analysierten RNAs aus *A. aeolicus* und klassischen P RNAs von Bakterien berücksichtigt werden, dass es sich bei der RNA-Komponente der *A. aeolicus* RNase P sehr wahrscheinlich um keine klassische bakterielle P RNA handelt. Ein Hinweis hierfür ist die Abwesenheit eines Gens im Genom von *A. aeolicus*, das für eine klassische RNase P RNA kodiert (Swanson 2001). Auch in dieser Arbeit durchgeführte heterologe Rekonstitutionsexperimente weisen darauf hin, dass es sich bei der *A. aeolicus* RNase P um kein klassisches bakterielles RNase P-Enzym handelt (siehe auch 4.3.1).

Nicht-kodierende RNAs haben im Allgemeinen einen hohen GC-Gehalt. Demzufolge wird auch für eine nicht-kodierende RNA, die an der RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* beteiligt ist, ein hoher GC-Gehalt erwartet. Im Rahmen eines Kooperationsprojekts zum Nachweis von nicht-kodierenden RNAs und *antisense* RNAs in *A. aeolicus* (siehe 4.9 und Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)) erwies sich die Amplifikation von GC-reichen Sequenzen aus *A. aeolicus* als schwierig und gelang nur mittels eines speziellen DNA-Polymerase-Mix („Long PCR Enzyme Mix“, siehe auch (3.2.3.4.2)). Versuche mit anderen Polymerasen blieben erfolglos. Demnach ist nicht auszuschließen, dass bei der Generierung der cDNA-Bibliotheken im Rahmen der Sequenzierung der RNA-Proben von *A. aeolicus* nicht alle GC-reichen RNAs erfolgreich amplifiziert werden konnten. Demzufolge ist es möglich, dass eine bzw. mehrere RNAs, die für die RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* essenziell sind, in den analysierten Datensätzen nicht vertreten sind. Auch wenn bei dieser Analyse keine offensichtlichen RNase P RNA-Kandidaten identifiziert werden konnten, so wurde die Beteiligung einer RNA-Komponente an der RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (4.3 und 4.4). Welche genaue Funktion die RNA-Komponente dabei ausübt, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

4.5.3.1 Vorkommen der analysierten RNAs innerhalb der *Aquificales*

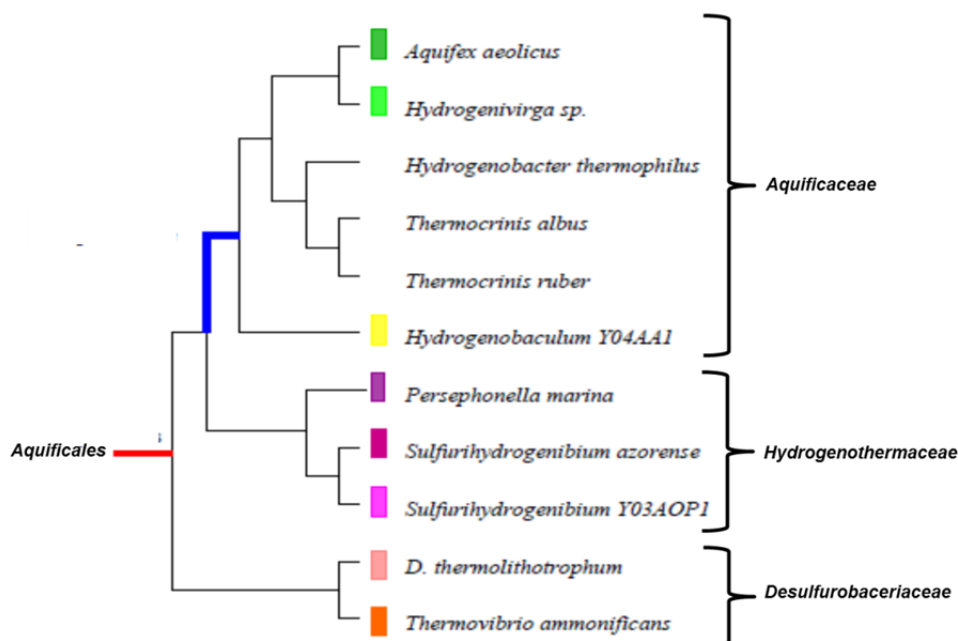


Abbildung 4.8: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Genom- und 16S rRNA-Analysen. Modifiziert nach „Genomewide comparison and novel ncRNAs of *Aquificales*“. ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4).

In den *Aquificales* konnten RNase P RNAs bereits in allen Spezies der Familie der *Hydrogenothermaceae* (vergl. Abbildung 4.8) identifiziert werden, deren Genom sequenziert ist. Das gilt ebenso für alle Spezies, die zur Familie der *Desulfurobacteriaceae* gehören (Marszalkowski *et al.* 2006), ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4). Nur in den *Aquificaceae* konnten bislang keine RNase P RNAs identifiziert werden. Diese Familie unterscheidet sich auch in Bezug auf andere nicht-kodierende RNAs (z.B. tmRNA) von denen der anderen *Aquificales* (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck). Deswegen wurden die aus den Sequenzierungsdaten herausgefilterten RNAs (siehe oben, 4.5.3)

dahingehend untersucht, ob sie nur in den *Aquificaceae*, nicht aber in den anderen *Aquificales*, vertreten sind. Dieses Kriterium traf auf die RNAs „n32“ und „unk2“ zu, die jedoch nicht in allen Spezies der *Aquificaceae* vertreten sind. Die 6S RNA ist in allen *Aquificaceae* und *Hydrogenothermaceae* - unter Berücksichtigung einer sehr geringen Sequenzhomologie - identifiziert worden. In den *Desulfurobacteriaceae* ist die Identifizierung der 6S RNA noch nicht eindeutig geklärt (siehe auch Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)).

4.5.3.2 Anreicherung nicht-kodierender RNAs in RNase P-angereicherten Extrakten

Bei der Analyse der Sequenzierungsdaten wurde unter anderem untersucht, welche nicht-kodierenden RNAs in der sequenzierten Probe B (angereichert auf RNase P-Aktivität) gegenüber Probe A (partiell aufgereinigt) und gegenüber den Basiswerten (*A. aeolicus* Gesamt-RNA) angereichert waren. Dabei fiel auf, dass unter anderem die 6S RNA angereichert worden war, wobei berücksichtigt werden muss, dass die „Readcoverage“ (Read-Abdeckung) für Probe B um den Faktor 1,5 höher war als für Probe A. Die Anreicherung der 6S RNA wurde mit Hilfe des Integrated Genome Browser (IGB) visualisiert (Nicol *et al.* 2009) und ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

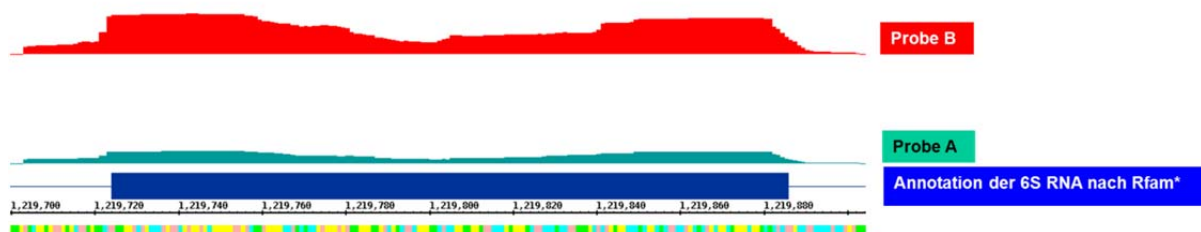


Abbildung 4.9: 6S RNA-Anreicherung in Probe B (rot) gegenüber Probe A (cyanblau). Probe B war auf RNase P stark angereichert, Probe A nur partiell aufgereinigt. Die Read-Abdeckung von Probe B ist um den Faktor 1,5 höher als von Probe A. Visualisierung im Integrated Genome Browser. Lokalisation im Genom: 1219700 – 1219900 auf Chromosom NC_000918 (*A. aeolicus*). Skala: 1 – 1000 Sequenzierungsreads. *Rfam-Annotation: (Burge *et al.*).

Unter Berücksichtigung ribosomaler RNAs fiel bei der Datenanalyse desweiteren auf, dass in der auf RNase P-Aktivität angereicherten Probe B die 16S rRNA im Vergleich zur partiell aufgereinigten Probe A stärker repräsentiert war. Die 23S rRNA ist vergleichsweise abgereichert. Die 16S rRNA-Anreicherung ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

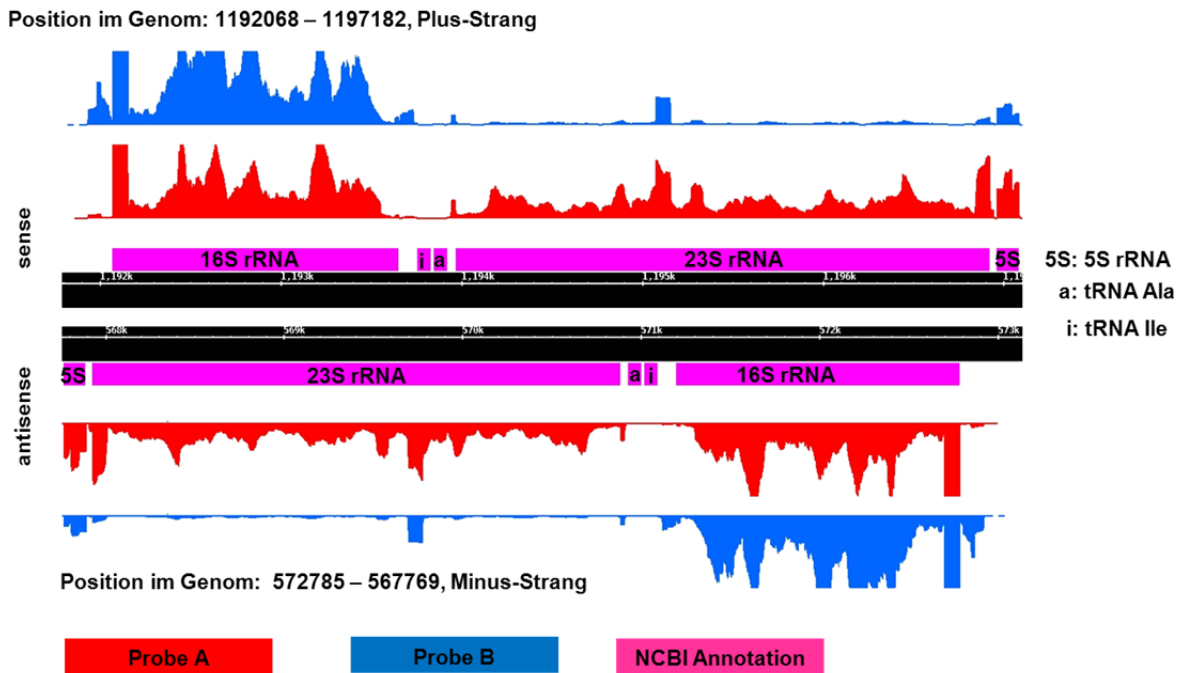


Abbildung 4.10: Anreicherung von 16S rRNA Transkripten, im Integrated Genome Browser dargestellt. Probe B (blau): angereichert auf RNase P-Aktivität. Probe A (rot): partiell aufgereinigt, nicht spezifisch auf RNase P angereichert. Read-Abdeckung Probe B : Probe A = 1,5 : 1. Die 16S rRNA liegt in Probe B gegenüber Probe A angereichert vor. Oben ist das eine rRNA-Operon von *A. aeolicus* in Plus-Strang-Orientierung, unten das zweite in Minus-Strang-Orientierung dargestellt. Skala: 1 – 10000 Sequenzierungsreads. Die Positionsangaben beziehen sich auf Chromosom NC_000918 (*A. aeolicus*).

Betreffs der parallelen Anreicherung von RNase P-Aktivität und 16S rRNA können mit Hinblick auf die Aufreinigungsmethode folgende Überlegungen angestellt werden:

Die bakterielle 16S rRNA hat eine Masse von etwa 523 kDa. Der Kalibriergeraden zufolge eluiert ein Molekül mit einer Masse von 523 kDa auf der Gelchromatographie-Säule nach etwa 14 ml (4.1.5.1.3). Auf die Gelchromatogramme bezogen (siehe Abbildung 4.4 und 4.5), entspricht das jeweils ungefähr dem UV-Maximum des zweiten Elutionspeaks. Die maximale RNase P-Aktivität eluiert immer kurz nach Erreichen der maximalen UV-Absorption im zweiten Elutionspeak und geht mit abfallender UV-Absorption einher. Unter der Annahme, dass sich die Elutionsvolumina der 16S rRNA und der RNase P-Aktivität auf diese Weise partiell überlagern, ist die Anreicherung der kleinen ribosomalen RNA durch die Vereinigung der RNase P-aktiven Gelchromatographie-Fractionen denkbar. Es ist aber auch möglich, dass - wie in *B. subtilis* (Barrera and Pan 2004) - die RNase P von *A. aeolicus* an die kleine Untereinheit des Ribosoms assoziiert ist und infolge guter Aufreinigungseffizienz zum Teil abgetrennt werden kann.

4.5.4 Fazit der RNA-Sequenzierung

Aus den Sequenzierungsdaten zweier RNA-Präparationen, von denen die erste partiell aufgereinigt und die zweite auf RNase P-Aktivität deutlich angereichert worden war, wurden anhand definierter Parameter (siehe 4.5.2) RNAs herausgefiltert, die als mögliche RNase P RNAs in Betracht gezogen werden könnten. Nähere *in silico* Untersuchungen der identifizierten RNAs bezüglich Funktion und Struktur ergaben jedoch keine Hinweise auf RNase P-Identität. Bei der Untersuchung, inwieweit die RNAs innerhalb der *Aquificales* vertreten sind, erwiesen sich die RNAs „n32“ und „unk2“ als interessant. Beide sind nur in einigen *Aquificaceae*-Spezies vertreten, nicht aber in anderen *Aquificales*. Als auffällig

erwies sich die Anreicherung der 6S RNA und der 16S rRNA in der Probe, die auf RNase P-Aktivität angereichert worden war. Die Anreicherung der 30S ribosomalen RNA könnte auf eine Assoziation der *A. aeolicus* RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit hindeuten, die auch für *B. subtilis* RNase P nachgewiesen wurde (Barrera and Pan 2004).

4.6 Untersuchung einer putativen *A. aeolicus* P RNA auf RNase P-Aktivität

In der Arbeitsgruppe von Prof. I. Hofacker (Universität Wien) wurde bioinformatisch eine potentielle *A. aeolicus* P RNA identifiziert. Die RNA ist auf dem Genom an Position gi|15282445: 399120 - 399321 kodiert. Eine 2D-Strukturvorhersage ist im Anhang dieser Arbeit abgebildet (7.7). Daraufhin wurde zunächst die Expression der putativen P RNA mittels Northern Blot-Analyse (3.2.4.7) untersucht. Gesamt-RNA von *A. aeolicus* (20 µg) sowie unterschiedliche Mengen eines *in vitro* Transkripts der putativen *A. aeolicus* P RNA (Positiv-Kontrolle; 10 pmol, 2 pmol und 0,4 pmol) wurden mittels PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.2.4.7.1). Anschließend erfolgte das Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran und die Hybridisierung mit einer Digoxigenin-modifizierten LNA-Sonde (siehe 3.1.6 und 3.2.4.7.2). Dabei konnten jedoch keine Transkripte in der Gesamt-RNA detektiert werden (Abb. 4.11).

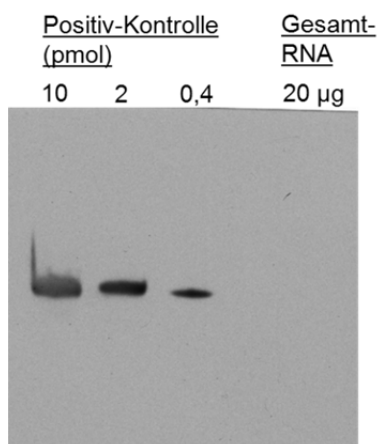


Abbildung 4.11: Expressionsanalyse einer putativen *A. aeolicus* RNase P RNA in *A. aeolicus* Gesamt-RNA mittels Northern Blot. Neben *A. aeolicus* Gesamt-RNA wurden 0,4 – 10 pmol eines *in vitro* Transkripts der putativen *A. aeolicus* P RNA als Positiv-Kontrolle aufgetragen. Das Auftragen abnehmender Mengen der Positiv-Kontrolle diente zur Einschätzung der Expressionsstärke bei möglicher Signal-Detektion in der Gesamt-RNA. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-modifizierten LNA-Sonde.

Zusätzlich wurden in Kooperation mit Dr. M. Lechner (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) die Daten der RNA-Seq-Analysen (4.5.1) auf diesen RNA-Kandidaten hin inspiziert. Jedoch konnten in den Bibliotheken der partiell aufgereinigten und RNase P-angereicherten Proben A und B keine entsprechenden Reads identifiziert werden. Daraufhin erfolgte eine biochemische Analyse der RNA bezüglich RNase P-Aktivität. Für die Versuche wurde zunächst ein *in vitro* Transkript der putativen P RNA hergestellt (3.2.4.2.1). Das Templat für die *in vitro* Transkription wurde von genomischer *A. aeolicus* DNA unter Verwendung eines T7-Promoter-kodierenden *forward*-Primers PCR-amplifiziert (3.2.3.4.2). Das gelaufgereinigte Transkript wurde dann für die folgenden Analysen verwendet.

4.6.1 Test auf RNA-allein Aktivität

Zunächst wurde getestet, ob die putative P RNA in Abwesenheit von Proteinkomponenten eine katalytische tRNA-Prozessierungsaktivität aufweist. In einem Enzymtest (3.2.6.2) konnte in Gegenwart von 20 mM Mg²⁺ sowohl mit 250 nM als auch mit 750 nM RNA keine RNase P-Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte hingegen eine RNA-allein Aktivität der *B. subtilis* P RNA (25 nM) und der *E. coli* P RNA (360 nM) detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.2 RNA-Komplementation partiell gereinigter Extrakte

Hier wurde im Enzymtest (3.2.6.2) analysiert, ob durch das Hinzufügen der putativen P RNA zu partiell aufgereinigten RNase P-aktiven Fraktionen aus *A. aeolicus* eine Aktivierung der RNase P-Aktivität bewirkt werden kann. Die getesteten Fraktionen stammten aus verschiedenen Aufreinigungsphasen (siehe Beispiel in Abb. 4.12). Konkret wurde das *in vitro* Transkript der putativen P RNA (Endkonzentration im Reaktionsansatz: 750 nM) zu RNase P-aktiven Aufreinigungsfraktionen von *A. aeolicus* (jeweils 10 µl) hinzugefügt und die Prozessierungs-Reaktion durch Zugabe des Prä-tRNA-Substrats gestartet (t = 0). Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (Zeitwerte: 1 min, 5 min, 20 min und 60 min) wurden Aliquots entnommen und auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert (3.2.6.3). Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen entweder kein *in vitro* Transkript bzw. anstelle der putativen P RNA eine Träger-RNA (*B. subtilis* 6S-1 RNA) in gleicher Endkonzentration (750 nM) hinzugefügt wurde. Die Substratumsätze zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden dann für die verschiedenen Reaktionen (mit putativer P RNA, mit Träger-RNA, ohne exogene RNA-Zugabe) verglichen. Als weitere Positiv-Kontrolle wurde *E. coli* P RNA eingesetzt (7,2 pmol). Bei allen getesteten Aufreinigungsfraktionen von *A. aeolicus* war keine Aktivierung der RNase P-Aktivität durch Zusatz der putativen P RNA zu beobachten (siehe Beispiel in Abb. 4.12). Folglich besitzt diese RNA unter den gegebenen Reaktionsbedingungen keine katalytische Prozessierungsaktivität bzw. es findet keine enzymaktivierende Interaktion mit der endogenen *A. aeolicus* RNase P statt.

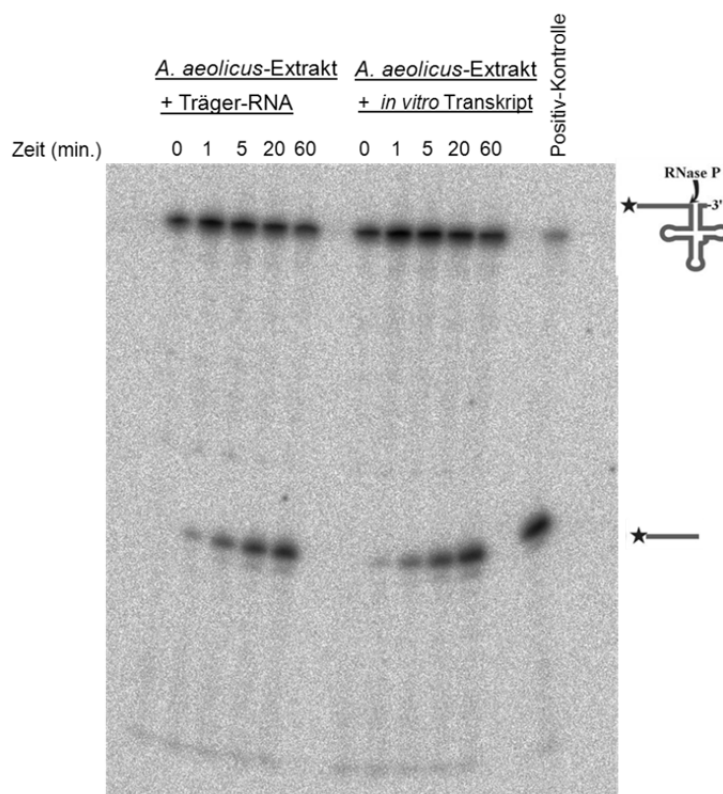


Abbildung 4.12: Prä-tRNA 5'-Prozessierungskinetik eines partiell aufgereinigten Zellextrakts von *A. aeolicus*, dem entweder eine putative *A. aeolicus* P RNA (*in vitro* Transkript) oder *B. subtilis* 6S-1 RNA als Kontrolle (Träger-RNA), jeweils mit einer Endkonzentration von 750 nM, hinzugefügt wurde. Die verwendete *A. aeolicus*-Fraktion wurde durch Fällung von RNase P-aktiven DEAE-Fractionen mit 2 M (NH₄)₂SO₄ hergestellt. Die RNase P-aktive Überstand-Fraktion wurde anschließend über einer Octyl Sepharose-Säule aufgereinigt. Positiv-Kontrolle: Prozessierung mit *E. coli* P RNA. Für Details, siehe Text.

4.6.3 Kombination der putativen P RNA mit *B. subtilis* RNase P Protein

Der folgende Test sollte klären, ob die putative *A. aeolicus* P RNA durch ein bakterielles P Protein katalytisch aktivierbar ist. Dazu wurde die *in vitro* transkribierte RNA (Endkonzentration im Reaktionsansatz: 250 nM) entweder unmittelbar vor der heterologen Holoenzym-Rekonstitution (3.2.6.5) mit *B. subtilis* Protein für 3 min bei 95 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt oder die heterologe Holoenzym-Rekonstitution erfolgte ohne zusätzliche Präinkubation der putativen P RNA. Das Verhältnis von *B. subtilis* RNase P Protein zu der putativen P RNA im Test war 10 : 1, 4 : 1 oder 1 : 1. In einem parallel dazu durchgeführten Enzymtest wurde unter identischen Reaktionsbedingungen die Aktivität des *B. subtilis* RNase P Holoenzym ermittelt (Zeitwerte: 1 min und 120 min). Die Auswertung erfolgte wie unter "RNA-Komplementation partiell gereinigter Extrakte" (4.6.2) beschrieben. Prä-tRNA-Prozessierung durch ein rekonstituiertes Holoenzym aus *B. subtilis* P Protein und der putativen *A. aeolicus* P RNA konnte in keinem Reaktionsansatz detektiert werden. Auch die zusätzliche 3-minütige Präinkubation der RNA zeigte keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.6.4 Kombination der putativen P RNA mit dem *B. subtilis* RNase P Holoenzym

Vom Versuchsablauf vergleichbar mit den Enzymtests partiell gereinigter RNase P-aktiver Fraktionen aus *A. aeolicus* (siehe 4.6.2.) wurde die zu testende *A. aeolicus* RNA-Komponente dem *B. subtilis* RNase P Holoenzym (3.2.6.2) hinzugefügt. Sinn des Experiments war die Klärung der Frage, ob die *A. aeolicus* RNA möglicherweise mit dem *B. subtilis* P Protein interagieren kann, ohne katalytisch aktiviert zu werden (z.B. aufgrund des Fehlens weiterer Enzymkomponenten). Für diesen Fall würde man eine kompetitive Inhibierung des *B. subtilis* Holoenzym durch die *A. aeolicus* RNA erwarten. Auch bei diesen Versuchen wurde das *A. aeolicus in vitro* Transkript zusätzlich - wie in 4.6.3 beschrieben - bei 95 °C präinkubiert bevor es mit der *B. subtilis* P RNA zusammengebracht wurde. Das Verhältnis der putativen *A. aeolicus* RNA zu *B. subtilis* P RNA und P Protein im Reaktionsansatz war 1 : 1 : 10, 10 : 1 : 10 oder 30 : 1 : 10. Entsprechende Enzymtests wurden bei denselben Konzentrationsverhältnissen mit Träger-RNA (*B. subtilis* 6S-1 RNA) anstelle der putativen P RNA durchgeführt. Hier betrug die Inkubationsdauer 2 min und 120 min. Auch bei diesen Enzymtests konnte durch Zusatz der *A. aeolicus* RNA keine Veränderung der Prozessierungsaktivität des *B. subtilis* RNase P Holoenzym festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.6.5 Ergebnis der Untersuchungen der putativen *A. aeolicus* RNase P RNA

Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der bioinformatisch identifizierten RNA nicht um eine klassische bakterielle RNA-Untereinheit der RNase P handeln kann. In diesem Fall hätte man aufgrund der funktionellen Konservierung bakterieller RNase P-Untereinheiten einen Effekt bei Zusatz der RNA-Komponente zu *B. subtilis* RNase P Protein bzw. Holoenzym erwartet. Auch kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der analysierten RNA um eine Komponente der *A. aeolicus* RNase P handelt. In diesem Fall wäre durch Zusatz der *A. aeolicus* RNA zu partiell aufgereinigter *A. aeolicus* RNase P eine Veränderung der RNase P-Aktivität zu erwarten gewesen.

4.7 Proteinanalyse

Zur Proteinanalyse wurden sowohl Flüssigproben von Gelchromatographie-Fractionen als auch einzelne ausgeschnittene Gelbanden von Proteingelen massenspektrometrisch analysiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte in Kooperation mit dem Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg. Die Proben wurden nach einem Trypsin-Verdau mittels nanoLC-MS/MS an einer Orbitrap Velos Pro analysiert und anschließend wurden die gemessenen Peptidspektren mit Mascot (Matrix Science) und Sequest (Eng *et al.* 1994) Proteinen zugeordnet. Um die relative Quantität einzelner Proteine in Flüssigproben bestimmen zu können, wurde den untersuchten Gelchromatographie-Fractionen vor dem Trypsin-Verdau ein interner Standard (Cytochrom c, 50 ng) hinzugefügt.

4.7.1 Analyse von Flüssigproben

Für die Proteinanalyse wurden RNase P-aktive Gelchromatographie-Fractionen (Superose 6-Säule) untersucht, welche im Vorfeld zuerst mittels Anionenaustausch-Chromatographie (4.1.2) und anschließend per Hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC (3.2.7.2.2)) aufgereinigt worden waren. Wie unter 4.1.5 beschrieben, erfolgte die Aufreinigung der RNase P-aktiven Eluate von HIC-Stufe 3 (Elution bei 0,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und HIC-Stufe 4 (Elution bei 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) in separaten Größenausschluss-Chromatographien (GAC) (4.1.5.1.4). Nach der jeweiligen GAC-Aufreinigung wurden die Elutions-Fractionen mittels Enzymtest auf RNase P-Aktivität untersucht (3.2.6.2). Die Ansätze der Enzymtests wurden daraufhin in der Reihenfolge ihrer Elution von der Gelchromatographie-Säule auf ein PAA-Gel aufgetragen. In Abbildung 4.13 ist exemplarisch das Ergebnis eines solchen Enzymtests dargestellt. Die getesteten Fractionen wurden entsprechend der detektierten RNase P-Aktivität wie folgt bewertet: (-) Fractionen ohne bzw. mit wenig RNase P-Aktivität; (+) Fractionen mit zunehmender bzw. abnehmender Aktivität; (++) Fractionen mit maximaler Enzymaktivität. Um eine Korrelation zwischen der Zu- und Abnahme der Enzymaktivität und der Zu- und Abnahme einzelner Proteine in den untersuchten Proben herstellen zu können, erfolgte eine quantitative massenspektrometrische Analyse (siehe oben, 4.7).

Wie in Kapitel 4.1.4.3 erläutert, war bei der HIC-Aufreinigung auch in der letzten Elutionsstufe (HIC-Stufe 5) RNase P-Aktivität nachweisbar, jedoch erst nach Vereinigung und Ankonzentrierung von mindestens 4 dieser Elutions-Fractionen. Ein solches Konzentrat - genannt „Chance“ - wurde ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Folglich konnten die Analyse-Ergebnisse für die HIC-Fractionen der Stufen 3 und 4, die zusätzlich mittels GAC aufgereinigt waren, mit den Ergebnissen von in Stufe 5 eluierten RNase P-aktiven Fractionen auf übereinstimmende Proteine (vor dem Hintergrund ansonsten deutlich unterschiedlicher Proteinmuster) hin untersucht werden.

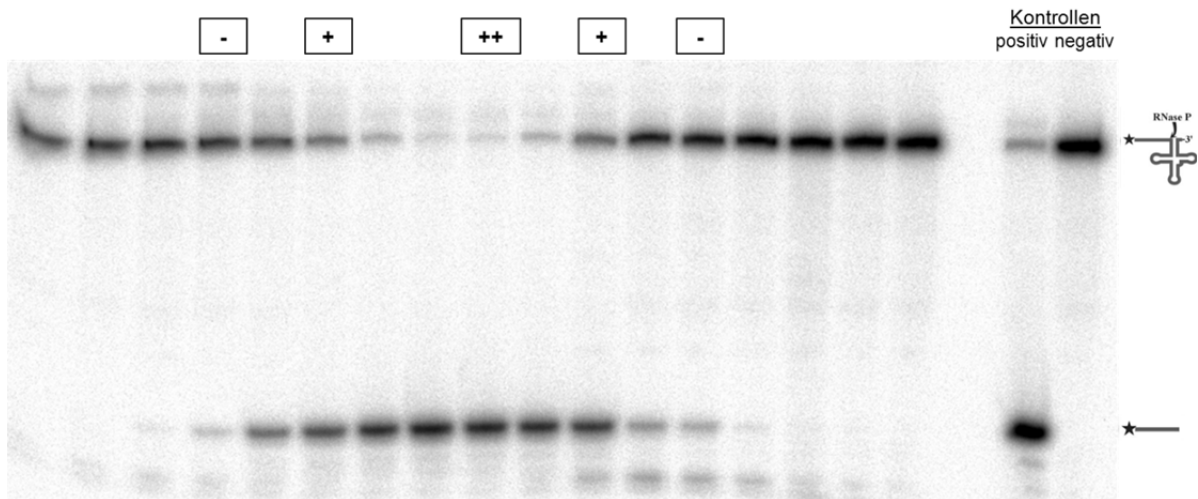


Abbildung 4.13: RNase P-Aktivitätstest (3.2.6.2) von Gelchromatographie-Fractionen in der Reihenfolge ihrer Elution. Von jeder Fraktion wurden je 10 µl in 1x Puffer A0 bei 10 mM Mg²⁺ für 30 min bei 37 °C mit dem Substrat *T. Thermophilus* Prä-tRNA^{Gly} inkubiert. Die Reaktionen der Positiv- (*E. coli* P RNA) und der Negativ-Kontrolle (Substrat ohne Zugabe von Enzymaktivität) erfolgten wie in 3.2.6.2 beschrieben. Bewertung der RNase P-Aktivität: (-) keine bis wenig RNase P-Aktivität; (+) zunehmende bzw. abnehmende Aktivität; (++) maximale Aktivität.

4.7.1.1 Auswertungsparameter der Flüssigproben-Analyse

Die massenspektrometrischen Daten wurden in Kooperation mit Dr. Marcus Lechner (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) ausgewertet. Zunächst wurden die massenspektrometrischen Daten der analysierten Proben einer von drei Kategorien zugeordnet, und zwar: [1] Probe mit nicht vorhandener bis wenig Enzymaktivität (-), [2] Probe mit zunehmender bzw. abnehmender Aktivität (+) oder [3] Probe mit maximaler RNase P-Aktivität (++). Die Quantität einzelner Proteine in den Proben wurde anhand der Summe der „Peptide Spectrum Matches“ (Σ PSMs) bewertet. Als Maß für die Sicherheit, mit der ein Protein identifiziert wurde, wurde die einem Protein zugeordnete „Summe der identifizierten Peptide“ (Σ Peptide) verwendet. Die durchschnittlichen Werte innerhalb der Gruppen (Σ PSMs) und (Σ Peptide) wurden für alle erkannten Proteine bestimmt. Proteine, die in den RNase P-aktiven Proben weniger als 1,25 verschiedene Peptide aufwiesen, wurden ignoriert. Für jedes Protein wurden die Werte mittels R (R-CoreTeam 2013) in einem Boxplot dargestellt. Mit BLAST+ (Camacho *et al.* 2009) und einem E-Value von 1e-05 wurde anhand der von der NCBI (NCBI-Resource-Coordinators 2014) öffentlich zur Verfügung gestellten Genome ermittelt, inwiefern die Proteine innerhalb und ausserhalb der *Aquificales* vertreten sind. Um die Zielorganismen einzuordnen, wurde die NCBI Taxonomie-Datenbank verwendet (NCBI-Resource-Coordinators 2014). Die Aminosäuresequenzen der identifizierten Proteine wurden mit ClustalW aligniert (Thompson *et al.* 2002). Die Strukturvorhersage der Proteine wurde mit dem PHYRE2 Protein Fold Recognition Server durchgeführt (Kelley and Sternberg 2009). Veröffentlichte Proteinstrukturen wurden von der RCSB Protein Datenbank geladen (Bernstein *et al.* 1978). Als Vorlage für die mitochondrial lokalisierte RNase P von *Arabidopsis thaliana*, PRORP1, wurde die Kristallstruktur mit der PDB ID 4G23 verwendet (Howard *et al.* 2012). Die Erzeugung struktureller Alignments wurde mit STAMP (Russell and Barton 1992) und PROMALS3D (Pei and Grishin 2014) durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit VMD (Humphrey *et al.* 1996).

4.7.1.2 Quantitative Auswertung der Flüssigproben-Analyse

Am stärksten waren das hypothetische Protein aq_880, die Glutaminsynthetase und das 30S ribosomale Protein S2 von *A. aeolicus* in den Fraktionen mit maximaler Enzymaktivität vertreten. Von den drei Proteinen ist nur aq_880 sowohl in den maximal RNase P-aktiven GAC-Fraktionen als auch den ankonzentrierten Stufe 5-Eluaten („Chance“) der HIC-Aufreinigung signifikant enthalten (siehe 4.7.1).

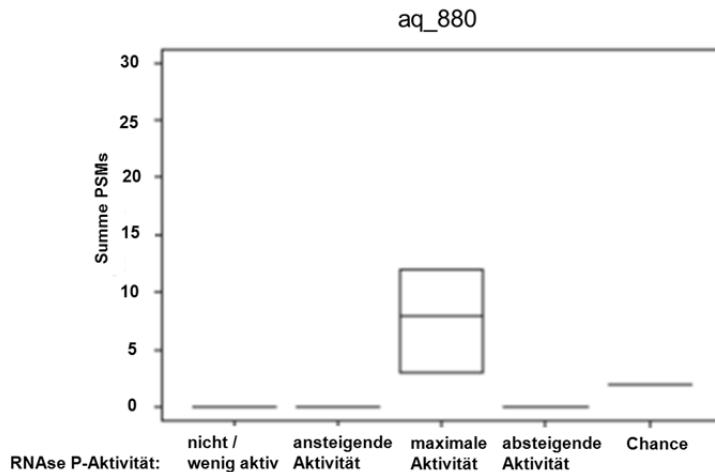


Abbildung 4.14: Boxplot des Proteins aq_880. Graphische Darstellung der Summe der *Peptide Spectrum Matches* (PSMs) für ein bestimmtes Protein (hier aq_880) in analysierten Gelchromatographie-Fraktionen mit geringer bis maximaler RNase P-Aktivität. Der PSMs-Wert ermöglicht eine quantitative Bewertung, in welcher Menge das entsprechende Protein in der analysierten Probe vorhanden war. Je höher der PSMs-Wert, desto mehr war von dem Protein in der Probe enthalten. „Chance“: ankonzentrierte RNase P-aktive HIC-Fraktionen (Elution bei Stufe 5).

In den Proben konnten insgesamt vier ribosomale Proteine identifiziert werden. Allerdings ist nur das ribosomale Protein S2 in Proben mit maximaler RNase P-Aktivität vertreten. Die drei anderen ribosomalen Proteine sind ausschließlich in den Proben mit ansteigender Enzymaktivität identifiziert worden. Wie auch unter 4.5.3.2 diskutiert, könnte dieses Ergebnis darauf zurückzuführen sein, dass sich die Elutionsvolumina der ribosomalen Proteine und der RNase P-Aktivität bei der gelchromatographischen Aufreinigung partiell überschneiden. Die Elution der ribosomalen Proteine erfolgt hauptsächlich am maximalen Punkt des zweiten Elutionspeaks, wo die RNase P-Aktivität in den getesteten Fraktionen erst zunimmt (siehe Abb. 4.4). Bei maximaler RNase P-Aktivität – im abfallenden Bereich des zweiten Elutionspeaks – erfolgt eine Co-Elution des ribosomalen Proteins S2, weil es als kleinstes der ribosomalen Proteine etwas später als der Großteil der ribosomalen Proteine eluiert. Andererseits könnte die RNase P von *A. aeolicus* mit der kleinen ribosomalen Untereinheit assoziiert sein. Solch eine Assoziation von RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit wurde für *B. subtilis* beschrieben (Barrera and Pan 2004).

Weniger stark als die oben genannten Proteine, aber dennoch reproduzierbar nachweisbar, waren die Proteine Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase (PNPase), das Transkriptions-Antiterminationsprotein NusB (N-Utilisations Substanz Protein B Homolog) und das hypothetische Protein aq_707 von *A. aeolicus* in den Proben mit maximaler RNase P-Aktivität vertreten. Die Proteine wurden anschließend einer bioinformatischen Strukturanalyse unterzogen (s. unten 4.7.1.3). Weitere graphische Darstellungen und Details zur quantitativen Auswertung der Flüssigproben befinden sich im Anhang dieser Arbeit (7.6).

4.7.1.3 Analyse von Struktur-Domänen

Anhand von Strukturvorhersagen können Rückschlüsse auf die Funktion hypothetischer Proteine gezogen werden. Strukturvorhersagen für Proteine lassen sich mit Hilfe des *Phyre2 Protein Fold Recognition Server* (Kelley and Sternberg 2009) erstellen, wobei die vorhergesagten Strukturen mit in der Protein Datenbank (PDB) hinterlegten bekannten Strukturen verglichen werden. Anhand der bekannten Funktion der in der PDB hinterlegten Struktur lassen sich Funktionsvorhersagen zu einzelnen Domänen der unbekannten Proteine machen. Im Hinblick darauf, dass ein oder mehrere Proteine mit RNase P-Aktivität gesucht werden, wurde der Fokus bei den Strukturanalysen vor allem auf RNA-bindende und endonukleolytische Funktionen gelegt. Auch Proteine mit bereits bekannter Funktion (z.B. Glutaminsynthetase, PNPase) wurden in die Strukturanalyse mit einbezogen, da die Möglichkeit besteht, dass diese funktionell bekannten Proteine weitere, bisher noch unbekannte Funktionen aufweisen.

Die Domänenanalyse und Funktionsvorhersage ergab, dass das hypothetische Protein aq_880 sowohl eine RNA-bindende Domäne aufweist als auch strukturell partiell mit einer PIN-Domäne übereinstimmt. Die PIN (*PilT N-terminal*)-Domäne gehört zu einer Nuklease-Strukturfamilie, zu der auch die katalytische Metallonuklease-Domäne der Protein-basierten RNase P-Enzyme (PRORP) gehört (Anantharaman and Aravind 2006), (Gobert *et al.* 2010), (Howard *et al.* 2012). Ein entsprechendes Struktur-Alignment von aq_880 und PRORP1 (Abbildung 4.15) deutet durchaus auf strukturelle Ähnlichkeiten hin. Die Vorhersage einer Endonuklease-Funktion sowie für PIN-Domänen charakteristische Metallionen-Bindungseigenschaften machen aq_880 zu einem engeren Kandidaten-Protein, das zumindest eine Untereinheit der RNase P von *A. aeolicus* repräsentieren könnte. Dies wäre nicht allzu überraschend, da alle bislang charakterisierten RNase P-Enzyme Metalloendonukleasen sind.

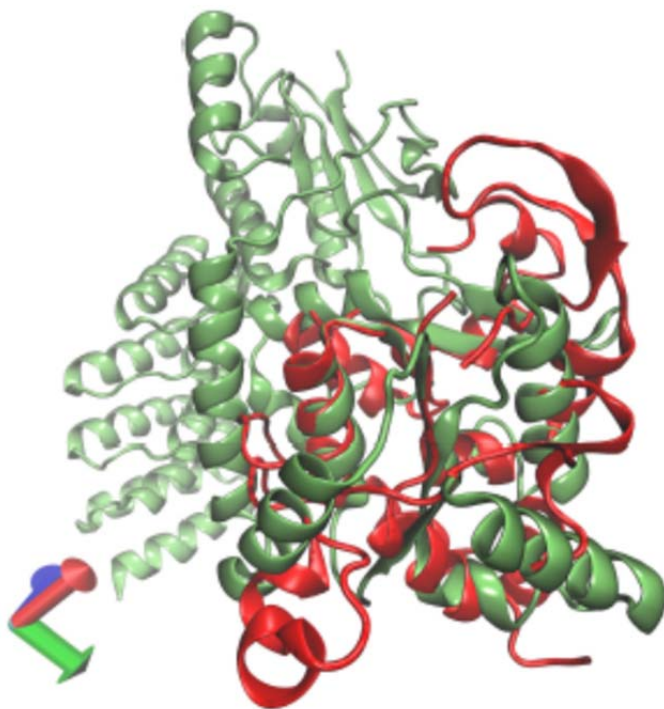


Abbildung 4.15: Struktur-Alignment von aq_880 (rot, vorhergesagt mittels *Phyre2*) und PRORP1 (grün, PDB ID: 4G23). Alignment: *STAMP*; Visualisierung: *VMD*.

Ein weiteres Protein, das strukturell analysiert wurde, ist das hypothetische Protein aq_707. Laut Struktur- und daraus abgeleiteter Funktionsvorhersage könnte dieses Protein an der tRNA 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin-Biosynthese beteiligt sein. Es zeigt partiell strukturelle Übereinstimmungen zum MnmC-Protein von *E. coli*, das ein bifunktionelles tRNA-Modifikations-Enzym ist (Kitamura *et al.* 2011). Eine endonukleolytische Funktion wurde dem Protein nicht zugewiesen, jedoch ist die tRNA-Modifikations-Funktion im Kontext der Suche nach der *A. aeolicus* RNase P von besonderem Interesse. So ist eine der drei Untereinheiten der humanen mitochondrialen RNase P eine tRNA Methyltransferase (TRMT10C) (Holzmann *et al.* 2008), (Vilardo *et al.* 2012).

Ein Protein mit bereits bekannter Struktur und Funktion ist die Glutaminsynthetase. Für dieses Enzym wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es im Laufe der Evolution in *A. aeolicus* zusätzliche Funktionen akquiriert haben könnte. Die Analyse der Glutaminsynthetase von *A. aeolicus* ergab jedoch keine Hinweise auf Sequenz/Struktur-Veränderungen gegenüber anderen bakteriellen Homologen, die solch einen Verdacht unterstützen könnten. Auch RNA-bindende Domänen konnten bei der Glutaminsynthetase nicht erkannt werden. Von dem Transkriptions-Antiterminationsprotein NusB ist hingegen bekannt, dass es sowohl RNA- als auch DNA-bindende Funktionen hat. Weitere (noch unbekannte) Funktionen, die im Hinblick auf mögliche RNase P-Eigenschaften interessant sein könnten, ließen sich jedoch nicht aus der Strukturanalyse ableiten. Die strukturelle Analyse der PNPase zeigte die bereits bekannten Ähnlichkeiten zu bakteriellen RNase P Proteinen auf. Die PNPase ist ein RNA-bindendes Protein, welches strukturell große Übereinstimmungen mit der RNase PH zeigt. Die Kerndomäne der PNPase ist der Gesamtstruktur der RNase PH sehr ähnlich (Ishii *et al.* 2003). Das wird auch durch die weiteren Strukturvorhersagen über die PNPase verdeutlicht, die mit 100 % Sicherheit und je 47 – 53 % übereinstimmender Identität nicht nur die „*Ribonuclease PH domain 2-like*“-Struktur, sondern auch die „*Ribosomal protein S5 domain 2-like*“-Struktur in dem Strukturvorschlag beinhalten. Die Verbindung zum RNase P Protein besteht darin, dass die Struktur-Superfamilie der „*Ribosomal protein S5 domain 2-like*“-Struktur nicht nur die Kerndomäne der PNPase und das ribosomale Protein S9 mit einschließt, sondern auch das bakterielle P Protein. Diese strukturelle Ähnlichkeit wurde bereits von Symmons *et al.* beschrieben (Symmons *et al.* 2000).

Zu den Struktur-Analysen und Funktionsvorhersagen sind weitere Details im Anhang (7.6) beschrieben.

Die Strukturvorhersagen und Schlussfolgerungen auf mögliche funktionelle Eigenschaften der Proteine basieren auf Berechnungen, die anhand der Aminosäuresequenzen der Proteine erstellt wurden. Für die Funktion der Proteine ist aber nicht nur die Sequenz, sondern auch die Faltung entscheidend. Bakterielle P Proteine beispielsweise besitzen eine stark konservierte Struktur und Funktion, die Aminosäuresequenzen der P Proteine variieren jedoch sehr und sind untereinander nur bis zu 10 % identisch (Koutmou *et al.* 2011), (Jovanovic *et al.* 2002). Auch stimmten die vorgeschlagenen Strukturen nicht vollständig mit den zum Vergleich herangezogenen Strukturen überein. Beispielsweise wurden die Domänen der PNPase mit einer Sicherheit von 100 % identifiziert, die Übereinstimmung mit der Gesamtstruktur betrug jedoch lediglich 50 %. Auch bei Protein aq_880 wurde die PIN- und Metall-bindende Domäne mit einer Sicherheit von 99 % identifiziert. Die Übereinstimmung mit den Gesamtstrukturen der zum Vergleich herangezogenen Domänen lag jedoch bei nur 33 %. Die jeweils (nur) partiellen strukturellen Übereinstimmungen mit den

genannten Domänen könnten darauf zurückzuführen sein, dass nur strukturell partiell übereinstimmende Domänen in der PDB-Datenbank verfügbar sind.

4.7.1.4 Vorkommen der Proteine innerhalb der *Aquificales*

Die *Aquificaceae* unterscheiden sich innerhalb der *Aquificales* von den beiden anderen Familien, den *Hydrogenothermaceae* und den *Desulfurobacteriaceae*, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene. So besitzt die tmRNA der *Aquificaceae* spezifische strukturelle Merkmale, die sich in den tmRNAs der anderen *Aquificales*-Familien nicht wiederfinden (siehe Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)). Auf Proteinebene ist ein Unterschied zwischen den genannten Familien beispielhaft am Alignment der Glutaminsynthetase gezeigt (siehe Abbildung 4.16). Anhand des Alignments ist gut zu erkennen, dass die Sequenz der Glutaminsynthetase im Allgemeinen innerhalb der *Aquificales* gut konserviert ist. Jedoch tritt um Position 170 eine Deletion von drei Aminosäuren auf, die ausschließlich bei den *Aquificaceae* zu beobachten ist. Auch die RNase P Enzyme der *Aquificaceae* scheinen sich von denen der anderen *Aquificales* zu unterscheiden, denn trotz intensiver bioinformatischer Analysen konnten weder P RNAs noch P Proteine in den *Aquificaceae* identifiziert werden. In allen sequenzierten Spezies der *Desulfurobacteriaceae* und *Hydrogenothermaceae* konnten hingegen die Gene für die RNase P-Untereinheiten identifiziert werden (siehe auch 4.5.3.1 und Anhang 7.4). Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen wurden die Proteine, die in den Proben mit maximaler RNase P-Aktivität überdurchschnittlich vorhanden waren, auf Abweichungen zu den *Hydrogenothermaceae* und *Desulfurobacteriaceae* untersucht. Insbesondere wurde analysiert, inwiefern die Proteine in den drei Familien der *Aquificales* vertreten sind.

Die Glutaminsynthetase, NusB, die PNPase und das ribosomale Protein S2 sind in allen drei Familien vertreten. Das hypothetische Protein aq_707 ist nicht in den *Desulfurobacteriaceae* und innerhalb der *Aquificaceae* auch nicht in *Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1 vertreten. Das hypothetische Protein aq_880 ist hingegen ausschließlich in den *Aquificaceae* – und innerhalb dieser Familie in jeder Spezies - und nicht in den anderen beiden Familien der *Aquificales* vertreten.

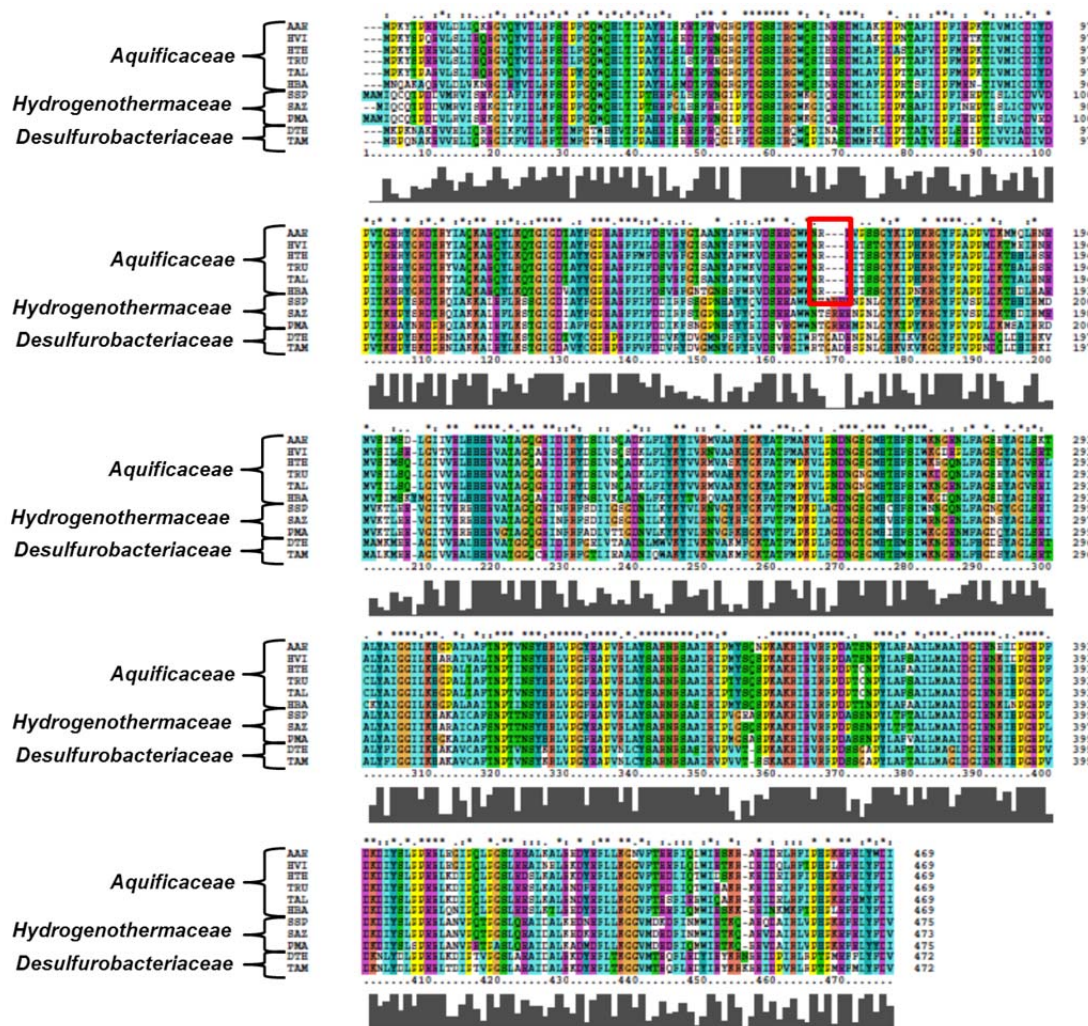


Abbildung 4.16: Alignment der Glutaminsynthetase mit ClustalW. Das Alignment veranschaulicht die Übereinstimmung bzw. Abweichung der Aminosäuresequenz zwischen den Familien, die zu den *Aquificales* gehören (*Aquificaceae*, *Hydrogenothermaceae* und *Desulfurobacteriaceae*). In den Aminosäuresequenzen, die im Allgemeinen innerhalb der *Aquificales* deutlich konserviert sind, ist bei Position 170 eine für die *Aquificaceae* spezifische Deletion zu erkennen (roter Kasten).

4.7.1.5 Fazit der Flüssigproben-Analyse

Bei der Analyse der auf RNase P-Aktivität angereicherten Flüssigproben konnten insgesamt sechs Proteine identifiziert werden, die signifikant in den Proben mit maximaler Enzymaktivität vertreten waren. Die Struktur- und Funktions-Vorhersage der Proteine ergab, dass die beiden hypothetischen Proteine aq_880 und aq_707 Eigenschaften besitzen, die mit einer RNase P-Aktivität in Verbindung stehen könnten. Für das Protein aq_880 werden endonukleolytische und RNA-bindende Funktionen vorhergesagt, die für RNase P-Enzyme charakteristisch sind. Besonders interessant ist eine strukturelle Ähnlichkeit zur katalytischen Metallonuklease-Domäne der PRORP-Enzyme. Strukturelle Ähnlichkeiten des Proteins aq_707 zu einem bifunktionellen tRNA-Modifikations-Enzym aus *E. coli* weisen auf eine Funktion bei der tRNA 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin-Biosynthese hin. Die Proteine PNPase und NusB haben ebenfalls strukturelle und funktionelle Eigenschaften, die mit RNase P-Aktivität in Verbindung gebracht werden können. Die strukturelle Ähnlichkeit der PNPase zu bakteriellen P Proteinen wurde bereits beschrieben (Symmons *et al.* 2000). Die Untersuchung der Proteine auf ihr Vorkommen in den einzelnen Familien der *Aquificales* ergab, dass nur Protein aq_880 eine Sonderstellung einnimmt, da es ausschließlich in den

Aquificaceae vertreten ist. Die Überlegung, dass P Proteine (und P RNAs) in den *Aquificaceae* noch nicht identifiziert werden konnten, weil sie sich von denen der anderen *Aquificales* strukturell stark unterscheiden, macht das hypothetische Protein aq_880 zu einem besonders interessanten Kandidaten. Somit deuten alle Befunde darauf hin, dass das Protein aq_880 eine Komponente der *A. aeolicus* RNase P ist. Die hohe Konzentration an ribosomalem Protein S2 in der Fraktion mit der höchsten RNase P-Aktivität könnte darauf hinweisen, dass die *A. aeolicus* RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit assoziiert ist.

4.7.2 Analyse ausgeschnittener Protein-Gelbanden

Um gezielt einzelne Proteine in RNase P-aktiven Fraktionen identifizieren zu können, wurden Protein-Gelbanden aus SDS-Gelelutionsfraktionen ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Um eine eindeutige Korrelation zwischen zunehmender, maximaler und abnehmender RNase P-Aktivität und dem Proteinmuster auf angefärbten Gelen herstellen zu können, wurden Proben von Superose 6-Gelchromatographie-Fraktionen (vorgereinigt mittels Anionenaustausch-Chromatographie (3.2.7.2.1) und Hydrophober Interaktions-Chromatographie (HIC (3.2.7.2.2)) in der Reihenfolge ihrer Elution bei der Größenausschluss-Chromatographie von zunehmender, maximaler und wieder abnehmender RNase P-Aktivität auf SDS-Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die RNase P-Aktivität der Fraktionen war zuvor mittels eines RNase P-Aktivitäts-Tests (3.2.6.2) ermittelt worden. Da eine gute Auftrennung sowohl im hoch- als auch niedermolekularen Bereich nicht gleichzeitig möglich war, wurde ein Gradientengel mit PAA-Konzentrationsstufen von 7 - 15 % angefertigt (3.2.5.1.1). Auf dem Stufengradientengel wurden dann Superose 6-Fraktionen analysiert, die im vorangegangenen HIC-Aufreinigungsschritt bei Stufe 4 eluiert worden waren. Das Bandenprofil des gefärbten Proteingels wurde anschließend mit den Ergebnissen der RNase P-Aktivitäts-Tests verglichen (siehe Abbildung 4.17). Daraufhin wurden gezielt Proteinbanden für die massenspektrometrische Analyse ausgeschnitten, die spezifisch in den Fraktionen mit der höchsten RNase P-Aktivität detektiert wurden.

Ergebnisse und Diskussion

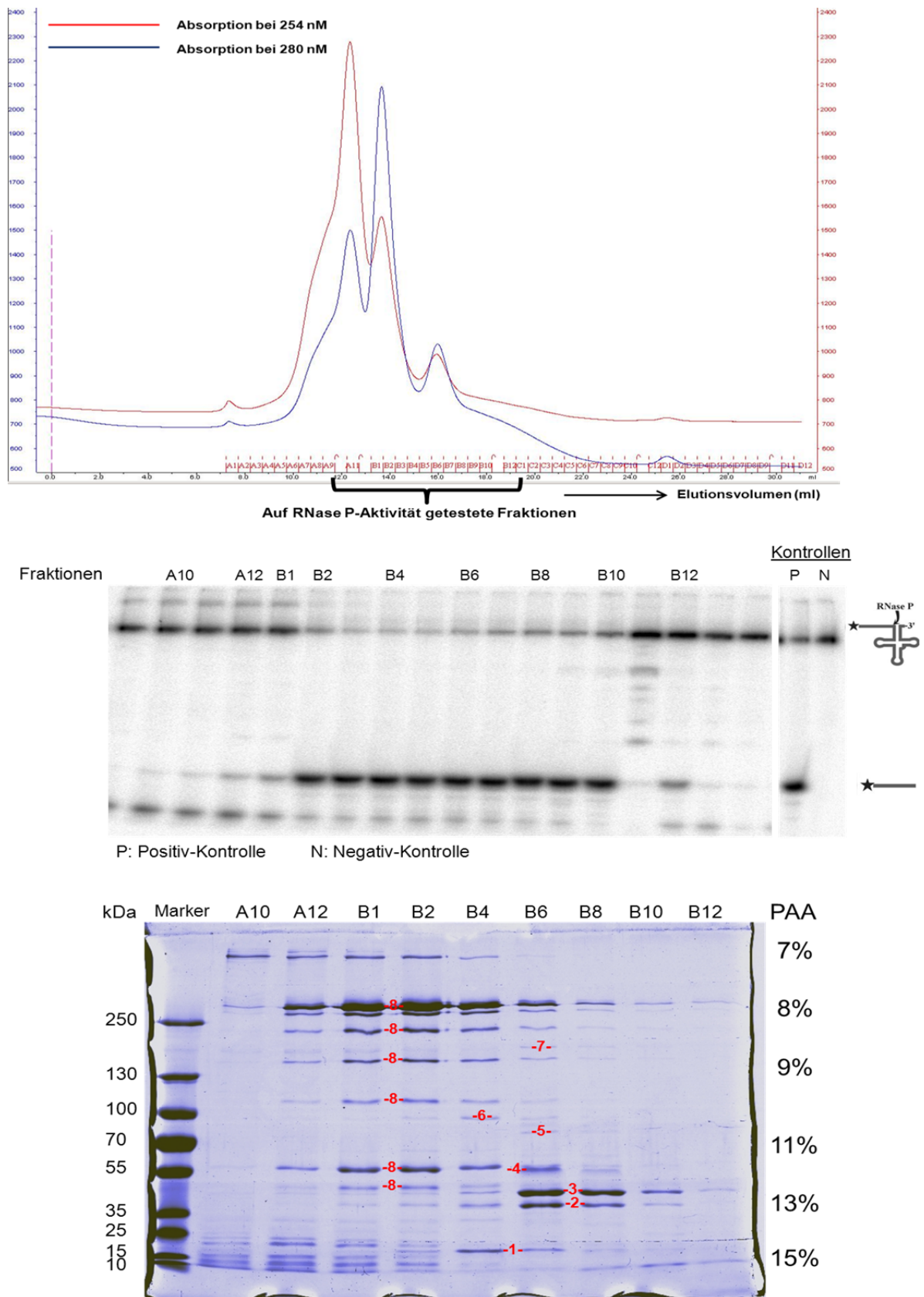


Abbildung 4.17: Oben: Elutionsprofil einer Größenausschluss-Chromatographie von HIC Stufe 4-Fractionen. Mitte: RNase P-Aktivitätstest der entsprechenden Gelchromatographie-Fractionen (vergleiche Bild oben) in der Reihenfolge ihrer Elution; durchgeführt wie in Abb. 4.13. Unten: Proteinmuster von je 15 µl der entsprechenden Gelchromatographie-Fractionen (vergleiche Bild oben und Bild mitte) auf einem Stufengradientengel (siehe 3.2.5.1.1)

1 - 8: massenspektrometrisch analysierte Gelbanden. 1: aq_880; 2: aq_707; 3: DNA-Polymerase β -Untereinheit/Cystein Desulfurase; 4: aq_707/Glutaminsynthetase; 5: aq_1754/aq_707; 6: PNPase; 7: aq_880/aq_707; 8: Glutaminsynthetase.

Ergebnisse und Diskussion

In Gelspur B4, die die Probe mit der höchsten RNase P-Aktivität repräsentiert, ist die Signalintensität der Proteinbanden 1 und 6 am stärksten. Die Proteinbanden wurden als das hypothetische Protein aq_880 (Bande 1) und als Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase (PNPase) (Bande 6) identifiziert. Das Protein aq_880 hat eine Masse von 22,5 kDa und die PNPase eine Masse von 86 kDa. Diese beiden Proteine wurden auch in den analysierten Flüssigproben mit maximaler RNase P-Aktivität nachgewiesen. Auch anhand einer bioinformatischen Strukturanalyse deutet vieles darauf hin, dass es sich bei den beiden Proteinen um Komponenten der *A. aeolicus* RNase P handelt (siehe auch 4.7.1.3). Das hypothetische Protein aq_707 ist in den Proteinbanden 2, 4, 5 und 7 nachgewiesen worden. Die Masse von aq_707 beträgt 40 kDa, so dass das Protein in Bande 5 bei etwa 80 kDa entweder auf ein Homo-Dimer von aq_707 oder auf eine Assoziation mit dem hypothetischen Protein aq_1754 (41 kDa) - das ebenfalls in der gleichen Gelbande identifiziert wurde - zurückzuführen ist. Den massenspektrometrischen Daten zufolge war aq_1754 drei bis viermal häufiger in der Proteinbande Nr. 5 nachweisbar als aq_707. Die Glutaminsynthetase wurde in Bande 8 bei 200 – 250 kDa identifiziert und ist ein Beispiel dafür, dass Multimere in SDS-Gelen nicht immer aufgetrennt werden. Das Enzym besteht in nativem Zustand aus 12 identischen 53,3 kDa-Untereinheiten, die in zwei Ringen aus je sechs Untereinheiten angeordnet sind. Die Glutaminsynthetase wurde auch in den Flüssigproben (4.7.1.2) signifikant nachgewiesen. Anhand der massenspektrometrischen Auswertung und der Enzymtests konnten die Elutionsprofile der Glutaminsynthetase und der RNase P-Aktivität miteinander verglichen werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Glutaminsynthetase etwas früher eluiert als die RNase P. Sie war maximal in den Proben vertreten, in denen die RNase P-Aktivität im Anstieg begriffen ist. Bei maximaler RNase P-Aktivität hingegen nehmen die Signale der Glutaminsynthetase bereits wieder ab. Desweiteren wurde das aq_707-Protein auch in Bande 4 identifiziert. Es erscheint als schwache Doppelbande direkt unterhalb der dominanten Bande der Glutaminsynthetase. Auch hier ist denkbar, dass aq_707 in einem Komplex mit einem anderen Protein vorlag. In Bande 7 wurde es zusammen mit aq_880 identifiziert, wobei aq_707 quantitativ etwas stärker in der Proteinbande vertreten war. Allerdings eluierte das Protein aq_707 hier etwas später als die maximale RNase P-Aktivität. Das Signal der Gelbanden, in denen aq_707 massenspektrometrisch nachgewiesen wurde, war im intensivsten, wenn die RNase P-Aktivität in den Enzymtests bereits wieder am Abnehmen war. Protein aq_1754 mit unbekannter Funktion zeigte das gleiche Elutionsverhalten wie Protein aq_707. Wie bereits oben erwähnt, wurde Protein aq_1754 (ca. 41 kDa) in Bande 5 auf der Höhe von etwa 80 kDa zusammen mit Protein aq_707 identifiziert. Da aq_1754 3 bis 4-mal so stark in der Proteinbande nachgewiesen wurde wie aq_707, wäre denkbar, dass es als Homodimer vorliegt oder teilweise auch als Heterodimer zusammen mit aq_707. Protein aq_1754 war jedoch nicht signifikant in den analysierten Flüssigproben mit maximaler RNase P-Aktivität vertreten. Allerdings stimmt das Protein mit der Teilstruktur (15 %) einer tRNA-Methyltransferase überein. Dies ist mit Hinblick auf die kürzlich identifizierte humane mitochondriale RNase P interessant, da eine der drei Untereinheiten (TRMT10C) dieses Proteinkomplexes ebenfalls eine tRNA-Methyltransferase ist (Holzmann *et al.* 2008), (Vilardo *et al.* 2012). Das ribosomale Protein S2, das signifikant in den untersuchten Flüssigproben mit maximaler RNase P-Aktivität vorhanden war, wurde in den analysierten Protein-Gelbanden nicht identifiziert. Auch das Transkriptions-Antiterminationsprotein NusB konnte in den analysierten Gelbanden nicht detektiert werden.

Die Auswertung der Gelchromatographie (siehe 4.1.5.2 und 4.1.5.3) ergab, dass die Fraktionen mit maximaler RNase P-Aktivität bei einem Molekulargewicht von 300 – 400 kDa eluieren. Die in den ausgeschnittenen Gelbanden identifizierten Proteine besitzen als Monomer jedoch alle eine bedeutend niedrigere Masse. Daher ist es denkbar, dass die Proteine unter nativen Bedingungen in stabilen Komplexen vorliegen, die unter den denaturierenden Bedingungen einer SDS-PAGE nur partiell aufgelöst werden können. Vorstellbar sind sowohl homomere als auch heteromere Interaktionen zwischen den Proteinen. Beispielsweise wurden bei der massenspektrometrischen Auswertung in Bande 7, die bezogen auf den Größenmarker zwischen 130 und 250 kDa läuft, die beiden Proteine aq_880 (22,5 kDa) und aq_707 (40 kDa) identifiziert. Auch in Bande 5, die zwischen den Banden der 70 kDa- und 100 kDa-Größenmarker läuft, konnten die beiden Proteine aq_1754 (41 kDa) und aq_707 nachgewiesen werden. Ferner ist auch eine Assoziation einzelner Proteine mit RNA-Komponenten nicht auszuschließen. Wie bereits erwähnt, konnte die essenzielle Beteiligung einer RNA-Komponente an der RNase P-Aktivität von *A. aeolicus* eindeutig nachgewiesen werden (siehe 4.3 und 4.4). Die Tatsache, dass nur durch eine Hochsalzbehandlung mit Magnesiumacetat/Essigsäure funktionelle RNA-Komponenten extrahiert werden konnten (4.3), deutet ebenfalls darauf hin, dass die RNA ungewöhnlich stabile Wechselwirkungen mit Proteinen eingeht. Auch mit Hinblick auf die extremen Lebensbedingungen, unter denen *A. aeolicus* existiert, erscheint dies sinnvoll. Desweiteren könnte eine Anreicherung der 16S rRNA (4.5.3.2) und des ribosomalen Proteins S2 (4.7.1.2) in RNase P-aktiven Aufreinigungsfractionen auf eine Assoziation der *A. aeolicus* RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit hindeuten. Solch eine Interaktion zwischen der kleinen ribosomalen Untereinheit und der RNase P, die für *B. subtilis* gezeigt wurde (Barrera and Pan 2004), werden wir gezielt untersuchen. So hat die Gruppe unseres Kooperationspartners Ciarán Condon (CNRS UPR9073, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich) bereits ribosomale Untereinheiten von *A. aeolicus* separiert, die wir auf RNase P-Aktivität testen wollen.

Die Banden, die oberhalb des 250 kDa-Proteins des Größenmarkers auf dem Proteingel detektiert wurden, weisen die maximale Signalstärke in dem Bereich auf, in dem die RNase P-Aktivität zunimmt, während ihre Intensität in den Fraktionen maximaler RNase P-Aktivität (um B4) wieder abnimmt.

4.8 5'-Prozessierung von Histidyl-tRNA in *A. aeolicus*

Nahezu alle tRNA-Varianten besitzen einen 7-Basenpaar-Akzeptorstamm. Histidin-tRNAs bilden jedoch eine Ausnahme, indem sie einen 8-Basenpaar-Akzeptorstamm aufweisen. Bis auf wenige Ausnahmen (Wang *et al.* 2007) besitzen Histidin-Prä-tRNAs ein Guanosin an Position [-1] und ein Cytosin an Position [73] (=Diskriminator). Dies ermöglicht eine zusätzliche Basenpaarung am Ende des Akzeptorstamms, die wiederum für die Beladung mit der Aminosäure Histidin durch die Histidin-spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase und damit für die Funktion der tRNA essenziell ist (Himeno *et al.* 1989), (Connolly *et al.* 2004). Das Guanosin an Position [-1] kann entweder genomisch kodiert sein oder posttranskriptionell durch eine Nukleotidyltransferase angefügt werden. Dies erfordert eine variable 5'-Prozessierung durch RNase P. In Bakterien ist das Guanosin an Position [-1] vorwiegend Genom-kodiert und die endonukleolytische Prä-tRNA^{His}-Prozessierung durch bakterielle RNase P erfolgt nicht wie sonst üblich an Position [-1/+1] sondern an Position [-2/-1] (Orellana *et al.* 1986).

Ergebnisse und Diskussion

In Eukaryonten wird die Prä-tRNA^{His} an der kanonischen Position [-1/+1] geschnitten und das Guanosin wird nach der 5'-Prozessierung durch eukaryontische RNase P von einer tRNA^{His}-Guanylyltransferase angefügt (Cooley *et al.* 1982), (Gu *et al.* 2005). Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass in Mitochondrien von *A. thaliana* beide Prozessierungsmechanismen vorhanden sind und die mitochondriale RNase P von *A. thaliana* (PRORP1) entsprechend die Prä-tRNA^{His} an beiden Positionen ([-1/+1] und [-2/-1]) prozessiert (Placido *et al.* 2010). Folglich kann man RNase P-Enzyme danach unterscheiden und einteilen, ob sie endonukleolytisch an Position [-1/+1], [-2/-1] oder ambivalent schneiden.

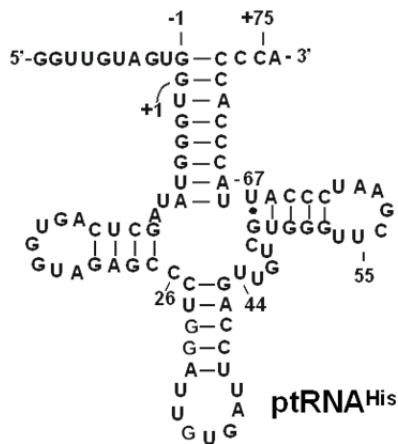


Abbildung 4.18: *E. coli* Prä-tRNA^{His}

Da über die Art der Prä-tRNA^{His}-Prozessierung auch Informationen über das RNase P-Enzym erhalten werden können, wurde untersucht, an welcher Position die Prä-tRNA^{His} von der *A. aeolicus* RNase P prozessiert wird. Für das Prozessierungsassay wurden verschiedene partiell aufgereinigte Fraktionen von *A. aeolicus* verwendet. Die verwendeten Fraktionen waren alle mittels DEAE-Chromatographie, HIC und Größenausschluss-Chromatographie (GAC) aufgereinigt worden, wobei die Methode der GAC zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht ausgereift war. Als Referenzsysteme wurden das *B. subtilis* RNase P Holoenzym (spaltet an Position [-2/-1]) und *A. thaliana* PRORP1 (spaltet an Position [-2/-1] und an Position [-1/+1]) gewählt.

Ergebnisse und Diskussion

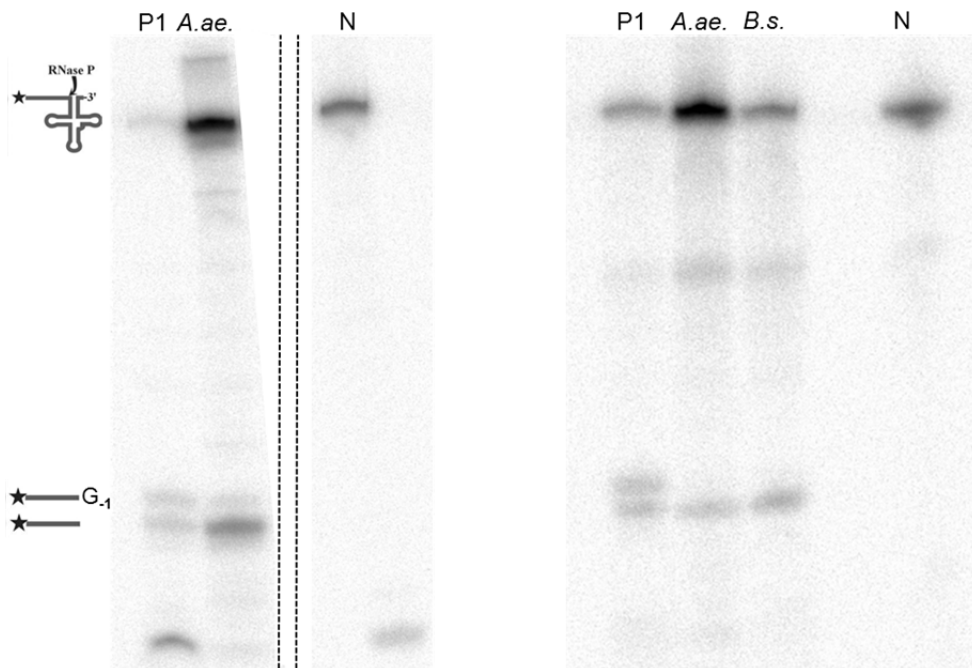


Abbildung 4.19: Prozessierung der *E. coli* Prä-tRNA^{His} durch PRORP1 (P1), partiell aufgereinigte Fraktionen von *A. aeolicus* (A.ae.) und durch *B. subtilis* Holoenzym (B.s.). Negativ-Kontrolle (N): Substrat ohne Zugabe von Enzymaktivität. Die Prozessierungsansätze wurden in Puffer A0 (*A. aeolicus*-Fraktionen) bzw. in KN-Puffer (*B. subtilis* Holoenzym, PRORP1) bei jeweils 4,5 mM Mg²⁺ für 20 min bei 37 °C inkubiert (siehe auch 3.2.6.4). Im Prozessierungsansatz lag PRORP1 in einer Endkonzentration von 1,1 µM und das *B. subtilis* Holoenzym von 4,8 nM vor. Von den *A. aeolicus*-Fraktionen wurden 2,5 µl im Spaltansatz eingesetzt.

Die Ergebnisse der Analysen zur Prä-tRNA^{His}-Prozessierung mit partiell aufgereinigten RNase P-aktiven Proben von *A. aeolicus* sind nicht eindeutig. Bei den ersten Versuchen konnten zwei 5'-Flanken-Produkte identifiziert werden (linkes Gelbild). Die Längen der beiden 5'-Flanken entsprechen denen von Spaltprodukten aus Reaktionsansätzen mit PRORP1 und somit endonukleolytischen Prozessierungen an den Positionen [-2/-1] und [-1/+1]. Das Verhältnis der Spaltprodukte untereinander ist bei den beiden RNase P-Aktivitäten jedoch unterschiedlich: während die Spaltung mit dem PRORP1-Enzym jeweils zu ca. 50 % an Position [-2/-1] und [-1/+1] erfolgt, spaltet die Aktivität aus *A. aeolicus* hauptsächlich an Position [-2/-1]. In anschließend durchgeführten Versuchen mit RNase P-aktiven *A. aeolicus*-Fraktionen konnte bei der Gelanalyse der Spaltprodukte nur noch eine 5'-Flanke detektiert werden. Diese läuft im Gel auf Höhe des mit dem bakteriellen RNase P-Enzym generierten Prozessierungsprodukts und resultiert demnach aus einer Prozessierung an der Position [-2/-1] (rechtes Gelbild). Anhand der Ergebnisse kann keine klare Aussage getroffen werden. Zum einen ist denkbar, dass durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der RNase P-Komplexe in den einzelnen *A. aeolicus*-Fraktionen die Spaltgenauigkeit variiert. Im Hinblick auf das relative Verhältnis der Prozessierung an Position [-2/-1] und [-1/+1] könnte es auch sein, dass bei den ersten Spaltungsversuchen Komponenten in den verwendeten *A. aeolicus*-Fraktionen vorhanden waren, die – auf das bakterielle System bezogen – eine „Fehlspaltung“ der endogenen RNase P an Position [-1/+1] begünstigten. Bei Protein-Analysen von *A. aeolicus* Flüssigproben und ausgeschnittenen Protein-Gelbänden mit maximaler RNase P-Aktivität wurde signifikant ein hypothetisches Protein identifiziert, das strukturelle Ähnlichkeiten zu PRORP1 aufweist (siehe 4.7.1 und 4.7.2). Das identifizierte hypothetische Protein aus *A. aeolicus* hat eine PIN-Domäne, welche in PRORP1 die katalytische Domäne für die Prä-tRNA-Prozessierung ist. Das würde mit einer ambivalenten Prozessierung der Histidyl-tRNA durch *A. aeolicus* RNase

P in Einklang stehen. Die in Abb. 4.19 gezeigten Ergebnisse legen jedoch eher nahe, dass der *A. aeolicus* RNase P-Komplex eher bakterientypisch an Position [-2/-1] prozessiert.

4.9 Nicht-kodierende RNAs und *antisense* RNAs in *A. aeolicus*

Im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit Dr. M. Marz (Universität Jena) wurden mittels Northern Blot-Analysen in Gesamt-RNA von *A. aeolicus* Transkripte nicht-kodierender RNAs (ncRNAs) nachgewiesen. Neben dem Nachweis bereits bekannter ncRNAs wurden auch neue, bioinformatisch vorhergesagte ncRNAs detektiert, deren Funktion noch unbekannt ist. In früheren experimentellen RNomics-Studien deutete sich an, dass zu vielen ncRNAs in *A. aeolicus* auch *antisense* RNAs transkribiert werden (Willkomm *et al.* 2005). Die Analyse des Transkriptoms von *A. aeolicus* verdeutlichte dann noch einmal auf der Basis umfangreicherer Datensätze, dass die Expressionsspiegel von *antisense* RNAs generell in *A. aeolicus* ungewöhnlich hoch sind. Auch in den hier durchgeführten Northern Blot-Analysen gelang der experimentelle Nachweis von RNA-Transkripten, die komplementär zu verschiedenen ncRNAs sind. So wurden *antisense* RNAs sowohl zu bekannten, bereits in anderen Bakterien identifizierten ncRNAs, als auch zu hier erstmals beschriebenen ncRNAs noch unbekannter Funktion nachgewiesen (siehe Anhang 7.4 (Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck)).

5 Zusammenfassung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Ribonuklease P (RNase P) in dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* mittels eines biochemischen Ansatzes zu identifizieren und zu charakterisieren. Die phylogenetische Einordnung der Gattung *Aquifex* ist bis heute nicht eindeutig geklärt und bioinformatische Analysen des *A. aeolicus*-Genoms führten nicht zur Identifizierung von Genen für RNase P-Komponenten. Folglich gestaltete sich die Etablierung einer Aufreinigungsmethode schwierig, da über die Biochemie der *A. aeolicus* RNase P nichts bekannt war. Trotz der schwierigen Ausgangssituation ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, eine semi-präparative native Aufreinigungsmethode zu etablieren, die wie angestrebt sowohl effizient als auch reproduzierbar ist. Die Methode besteht aus drei sukzessiven Aufreinigungsschritten, in denen nach Ladung, Hydrophobizität und Größe getrennt wird. Dadurch konnte die RNase P-Aktivität stark angereichert und ein Großteil der Zellkomponenten abgetrennt werden. Anschließend wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem aus den hochaufgereinigten RNase P-aktiven Proben eine separate Extraktion funktioneller Gesamt-RNA und Gesamt-Protein gelang. Aus diesen RNA- und Protein-Präparationen konnten erstmals RNase P-aktive Holoenzyme von *A. aeolicus* *in vitro* rekonstituiert werden. Die Rekonstitutionsexperimente belegen eindeutig, dass sowohl eine RNA- als auch eine Protein-Komponente für die RNase P-Aktivität in *A. aeolicus* essenziell ist. Zu Beginn der Arbeit, als die Holoenzymrekonstitution noch nicht entwickelt war, wurde eine vermeintliche P RNA, die von einer bioinformatischen Expertengruppe (Prof. I. Hofacker, Universität Wien) als *A. aeolicus* P RNA vorhergesagt wurde, getestet und auf experimenteller Basis als RNase P-Komponente ausgeschlossen. Ausführliche kinetische Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine Beteiligung der vorgeschlagenen RNA-Variante an der 5'-Prozessierung von Prä-tRNAs. Zudem war die RNA in RNA-Seq-Bibliotheken praktisch nicht repräsentiert, was gegen ihre Expression spricht.

Zur Ordnung der *Aquificales* gehören drei Familien: die *Desulfurobacteriaceae*, die *Hydrogenothermaceae* und die *Aquificaceae*. Bislang wurden RNase P-Enzyme nur in den sequenzierten Spezies der *Desulfurobacteriaceae* und der *Hydrogenothermaceae* gefunden, nicht aber in der Familie der *Aquificaceae*, zu denen auch *A. aeolicus* gehört. Da der Nachweis von RNase P-Aktivität in Zellfraktionen von *A. aeolicus* gelang, bioinformatisch jedoch weder ein bakterientypisches Gen für die RNA- noch für die Protein-Untereinheit der RNase P gefunden werden konnte, handelt es sich bei dem Enzym in diesem Bakterium mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine unkonventionelle Form der RNase P. Folglich wurde in den RNase P-angereicherten Fraktionen besonders nach Komponenten gesucht, die ausschließlich in *Aquificaceae*, nicht aber in den beiden anderen Familien der *Aquificales* vorkommen. Bei der RNA-Seq-Analyse von RNA-Extrakten, die auf RNase P-Aktivität angereichert worden waren, konnten zwei RNA-Transkripte identifiziert werden, die diesem Kriterium entsprechen. Die bioinformatische Analyse ergab, dass diese RNA-Varianten nur in - wenn auch nicht in allen - *Aquificaceae*-Spezies vorkommen, nicht aber in anderen *Aquificales*. Faltungsvorhersagen dieser RNAs ließen jedoch keine markanten strukturellen Ähnlichkeiten zu klassischen bakteriellen RNase P RNAs erkennen. Die RNA-Seq-Analyse zeigte zudem, dass parallel zur RNase P-Aktivität eine Anreicherung der 6S RNA und der 16S rRNA stattfindet. Die Anreicherung der 16S rRNA deutet auf eine Assoziation der RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit hin.

Zusammenfassung

Bei der Suche nach den Proteinkomponenten der *A. aeolicus* RNase P wurde mittels massenspektrometrischer Analyse sowohl die Identität als auch die Quantität der Proteine in den hochaufgereinigten Fraktionen mit maximaler RNase P-Aktivität bestimmt. Das Ergebnis wurde dann mit der Analyse von Fraktionen verglichen, die ansteigende oder abnehmende Enzymaktivität aufwiesen. Parallel dazu wurden auch RNase P-aktive Fraktionen entsprechend ihrer Elution beim 3. Aufreinigungsschritt auf einem SDS-Gradientengel aufgetrennt. Einzelne Proteinbanden, die gut mit der RNase P-Aktivität korrelieren, wurden daraufhin ausgeschnitten und ebenfalls einer massenspektrometrischen Analyse unterworfen. Durch einen Vergleich der Ergebnisse aller Analysen konnte ein 22,5 kDa Protein identifiziert werden (aq_880), das signifikant in hochaufgereinigten Proben mit maximaler RNase P-Aktivität vorhanden war. Bioinformatische Struktur- und Domänenvorhersagen ergaben, dass dieses Protein viele gestellte Suchkriterien erfüllt. So weist das Protein eine RNA-bindene Domäne auf, die zur Bindung des Prä-tRNA-Substrats bzw. einer RNA-Komponente erforderlich ist. Weiter wird dem Protein aufgrund einer vorhergesagten PIN-Domäne eine Endonuklease-Aktivität zugeschrieben. Solch eine Proteinfunktion wäre mit den Anforderungen an eine nicht kanonische bakterielle RNase P durchaus vereinbar. Die PIN-Domäne ist bei den erst kürzlich identifizierten PRORP-Enzymen, also den eukaryontischen Protein-basierten RNase P-Enzymen, nachweislich die katalytische Metallonuklease-Domäne. Zudem handelt es sich bei dem identifizierten aq_880-Protein um ein hypothetisches Protein unbekannter Funktion, das ausschließlich in den *Aquificaceae* vorkommt, nicht aber in den *Desulfurobacteriaceae* und *Hydrogenothermaceae*. Neben dem aq_880-Protein wurden in Fraktionen mit hoch aufgereinigter RNase P-Aktivität fünf weitere Proteine mit einer deutlichen, aber im Vergleich zu aq_880 geringeren Signifikanz angereichert. Dabei handelt es sich um das hypothetische Protein aq_707, das Strukturvorhersagen zufolge partiell mit dem bifunktionellen tRNA-Modifikations-Enzym MnmC aus *E. coli* übereinstimmt und demzufolge an der Synthese von 5-Methylaminomethyl-2-thiouridin beteiligt sein könnte, die Polyribonukleotid Nukleotidyltransferase (PNPase), das Transkriptions-Antiterminationsprotein NusB, das ribosomale Proteine S2 und die Glutamin-Synthetase. Die Auswertung der Gelchromatogramme der Größenausschlusschromatographie ergab, dass das Elutionsvolumen der Fraktionen mit der maximalen RNase P-Aktivität einer Masse von 300 - 400 kDa entspricht. Demnach ist denkbar, dass die RNase P in *A. aeolicus* als Bestandteil eines größeren Komplexes vorliegt. Hier könnten mehrere Enzyme des RNA-Metabolismus funktionell miteinander gekoppelt sein. Eine gleichzeitige Anreicherung des ribosomalen Proteins S2 und der 16S rRNA mit RNase P-aktiven Fraktionen könnte auch auf eine Assoziation der RNase P mit der kleinen ribosomalen Untereinheit hindeuten. Desweiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit die Transkripte sowohl bekannter als auch neu identifizierter nicht-kodierender RNAs aus *A. aeolicus* mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden. Auch die bei Transkriptomanalysen von *A. aeolicus* gefundene starke Transkription von *antisense* RNAs auf dem Gegenstrang nicht-kodierender RNA-Gene konnte experimentell mittels Northern Blot verifiziert werden ((Lechner, Nickel, Wehner *et al.*, im Druck), siehe Anhang 7.4).

6 Ausblick

Nachdem die Identifizierung der in RNase P-aktiven Fraktionen signifikant angereicherten Proteine gelang, sollen zunächst die erfolgversprechendsten Kandidaten rekombinant hergestellt werden. Da nicht bekannt ist, aus wievielen Untereinheiten die RNase P von *A. aeolicus* besteht, sollen die Proteine sowohl einzeln als auch kombiniert mit $\text{Mg}(\text{OAc})_2/\text{CH}_3\text{COOH}$ -extrahierter *A. aeolicus* RNA aus RNase P-aktiven Fraktionen rekonstituiert werden. Dem Beispiel von Holzmann *et al.* (2008, Abb. 3c) folgend, ist auch die Zugabe der rekombinanten Protein-Kandidaten (ebenfalls einzeln und in Kombination) zu hochaufgereinigten Größenausschluss-Chromatographie (GAC)-Fraktionen mit unterschiedlicher RNase P-Aktivität (ansteigend, maximal und abnehmend) naheliegend. Möglicherweise liegen die RNase P-Komponenten in GAC-Fraktionen mit ansteigender oder absteigender RNase P-Aktivität nicht im nativen stöchiometrischen Verhältnis vor. In diesem Fall könnte durch Zugabe der rekombinanten Protein-Kandidaten eine Steigerung der Prozessierungsaktivität bewirkt werden.

Auch soll eine mögliche Assoziation der *A. aeolicus* RNase P an die kleine ribosomale Untereinheit überprüft werden. Die Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Ciarán Condon (CNRS UPR9073, Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, Frankreich) hat bereits Sucrose-Dichtegradientenzentrifugationen zur Isolierung ribosomaler Untereinheiten von *A. aeolicus* durchgeführt, die in unserer Arbeitsgruppe auf RNase P-Aktivität getestet werden sollen. In der vorliegenden Arbeit konnte die essenzielle Funktion einer RNA-Komponente bei der Regenerierung von RNase P-Aktivität nachgewiesen werden. Da gleichzeitig mit der RNase P-Aktivität auch 16S rRNA angereichert wurde, könnten weitere Rekonstitutionsversuche durchgeführt werden. Hierfür könnte aus der 30S-Untereinheit von *A. aeolicus* extrahierte 16S rRNA zunächst mit Aceton-gefällten Protein-Fraktionen kombiniert werden. Im Fall einer erfolgreichen Rekonstitution könnten anschließend gezielt die einzelnen rekombinanten Protein-Kandidaten zur extrahierten 16S rRNA hinzugefügt werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse müssten die Rekonstitutionsversuche mit *in vitro* transkribierter 16S rRNA wiederholt werden. Sollte die gezielte Untersuchung der 16S rRNA negativ ausfallen, könnten weitere Proben RNase P-aktiver extrahierter RNA, die aus unterschiedlichen Aufreinigungsschritten stammen, sequenziert werden. Ein Vergleich der angereicherten RNAs aus RNase P-aktiven und nicht RNase P-aktiven Fraktionen könnte die Identifizierung weiterer potentieller RNase P RNA-Kandidaten ermöglichen.

Es ist wahrscheinlich, dass eine RNA-Komponente der *A. aeolicus* RNase P sehr GC-reich ist. Da die cDNA-Synthese von GC-reichen RNA-Varianten problematisch sein kann und diese dadurch in RNA-Seq-Analysen möglicherweise nicht erfasst werden, könnten verschiedene Protokolle für die cDNA-Synthese GC-reicher RNAs im Vorfeld einer Transkriptom-Analyse getestet werden.

Wenn die Komponenten der *A. aeolicus* RNase P identifiziert sind, soll schließlich eine detaillierte Charakterisierung des Enzyms hinsichtlich Katalyse- und Substratbindeeigenschaften erfolgen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen und Einheiten

7.1.1 Abkürzungen

A_{260}	Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge
<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
Abb.	Abbildung(en)
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
as	<i>antisense</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C5	Proteinuntereinheit der RNase P von <i>E. coli</i>
cam	Chloramphenicol
CBB	Coomassie Brilliant Blue
C_{end}	Endkonzentration
cpm	<i>counts per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)
CV	Column volume
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
demin.	demineralisiert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol

Anhang

E	Extinktion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm Wellenlänge
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EtOH abs.	absoluter (99,8 %) Ethanol
FF	Fast Flow
FPLC	Fast performance liquid chromatography
g	Gramm; x g: Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAC	Größenausschluss-Chromatographie
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert
L	Liter
LNA	locked nucleic acid
Lsg.	Lösung
M	molar [mol/l]
m	Meter
MBq	Megabecquerel
mg	Milligramm
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
min	Minute
MN	Micrococcal Nuclease
MPa	Mega Pascal
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> (Ausschlussgröße)
NaOAc	Natriumacetat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NBT	p-Nitroblau-tetrazoliumchlorid

Anhang

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotetraessigsäure
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte/Extinktion bei 600 nm Wellenlänge
p.a.	<i>pro analysi</i> (für die Analyse; Bezeichnung des Reinheitsgrades)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P Protein	Proteinuntereinheit der RNase P
P RNA	RNA-Untereinheit der RNase P
PRORP	Protein-basierte RNase P (<i>proteinaceous RNase P</i>)
psi	<i>pound-force per square inch</i> (14,5 psi = 1bar)
RevTr	Reverse Transkriptase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamin
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht

Anhang

Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
XCB	Xylencyanolblau
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl β -D-Galactopyranosid

7.1.2 Präfixe vor Einheiten:

f	Femto (10^{-15})	k	Kilo (10^3)
p	Pico (10^{-12})	M	Mega (10^6)
n	Nano (10^{-9})	G	Giga (10^9)
μ	Mikro (10^{-6})	T	Terra (10^{12})
m	Milli (10^{-3})		

7.2 Literaturverzeichnis

- Alifano, P., F. Rivellini, C. Piscitelli, C. M. Arraiano, C. B. Bruni and M. S. Carlomagno (1994) Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of a polycistronic mRNA. *Genes & development*. **8**, 3021-31.
- Altman, S. (2011) Ribonuclease P. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. **366**, 2936-41.
- Anantharaman, V. and L. Aravind (2006) The NYN domains: novel predicted RNases with a PIN domain-like fold. *RNA biology*. **3**, 18-27.
- Aravind, L., R. L. Tatusov, Y. I. Wolf, D. R. Walker and E. V. Koonin (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet.* **14**, 442-4.
- Barrera, A. and T. Pan (2004) Interaction of the Bacillus subtilis RNase P with the 30S ribosomal subunit. *RNA (New York, N.Y.)*. **10**, 482-92.
- Barrick, J. E., N. Sudarsan, Z. Weinberg, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker (2005) 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA (New York, N.Y.)*. **11**, 774-784.
- Beckmann, B. M. (2010) The Mechanism of PRNA-mediated Release of RNA Polymerase From Bacillus Subtilis 6S-1 RNA. <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2010/0758>. , Philipps-Universität Marburg
- Beckmann, B. M., A. Grunweller, M. H. Weber and R. K. Hartmann (2010) Northern blot detection of endogenous small RNAs (approximately 14 nt) in bacterial total RNA extracts. *Nucleic acids research*. **38**, e147.
- Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi and M. Tasumi (1978) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *Archives of biochemistry and biophysics*. **185**, 584-91.
- Bocchetta, M., S. Gribaldo, A. Sanangelantoni and P. Cammarano (2000) Phylogenetic depth of the bacterial genera Aquifex and Thermotoga inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. *J Mol Evol*. **50**, 366-80.
- Bothwell, A. L., R. L. Garber and S. Altman (1976a) Nucleotide sequence and in vitro processing of a precursor molecule to Escherichia coli 4.5 S RNA. *The Journal of biological chemistry*. **251**, 7709-16.
- Bothwell, A. L., B. C. Stark and S. Altman (1976b) Ribonuclease P substrate specificity: cleavage of a bacteriophage phi80-induced RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **73**, 1912-6.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**, 248-54.
- Brown, J. W. and E. S. Haas (1995) Ribonuclease P structure and function in Archaea. *Molecular biology reports*. **22**, 131-4.
- Brown, J. W., J. M. Nolan, E. S. Haas, M. A. Rubio, F. Major and N. R. Pace (1996) Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 3001-6.
- Burge, S. W., J. Daub, R. Eberhardt, J. Tate, L. Barquist, E. P. Nawrocki, S. R. Eddy, P. P. Gardner and A. Bateman Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res*. **41**, 226-232.
- Burggraf, S., G. J. Olsen, K. O. Stetter and C. R. Woese (1992) A phylogenetic analysis of Aquifex pyrophilus. *Syst Appl Microbiol*. **15**, 352-6.
- Busch, S., L. A. Kirsebom, H. Notbohm and R. K. Hartmann (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C(75) and G293-C(74) in the reaction catalyzed by Escherichia coli RNase P RNA. *Journal of molecular biology*. **299**, 941-51.
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer and T. L. Madden (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*. **10**, 421.

- Candiano, G., M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi and P. G. Righetti (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. **25**, 1327–1333.
- Chen, Y., X. Li and P. Gegenheimer (1997) Ribonuclease P catalysis requires Mg²⁺ coordinated to the pro-RP oxygen of the scissile bond. *Biochemistry*. **36**, 2425-38.
- Cho, I. M., L. B. Lai, D. Susanti, B. Mukhopadhyay and V. Gopalan (2010) Ribosomal protein L7Ae is a subunit of archaeal RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 14573-8.
- Connolly, S. A., A. E. Rosen, K. Musier-Forsyth and C. S. Francklyn (2004) G-1:C73 recognition by an arginine cluster in the active site of Escherichia coli histidyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*. **43**, 962-9.
- Cooley, L., B. Appel and D. Soll (1982) Post-transcriptional nucleotide addition is responsible for the formation of the 5' terminus of histidine tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **79**, 6475-9.
- Crary, S. M., S. Niranjanakumari and C. A. Fierke (1998) The protein component of Bacillus subtilis ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry*. **37**, 9409-16.
- Deckert, G., P. V. Warren, T. Gaasterland, W. G. Young, A. L. Lenox, D. E. Graham, R. Overbeek, M. A. Snead, M. Keller, M. Aujay, R. Huber, R. A. Feldman, J. M. Short, G. J. Olsen and R. V. Swanson (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus. *Nature*. **392**, 353-8.
- Dong, H., L. A. Kirsebom and L. Nilsson (1996) Growth rate regulation of 4.5 S RNA and M1 RNA the catalytic subunit of Escherichia coli RNase P. *Journal of molecular biology*. **261**, 303-8.
- Dyballa, N. (2008) Tipp 122: Sensitive Coomassie-Färbung. *Laborjournal*, pp 44-45, Lj-Verlag Herfort und Sailer
- Eng, J. K., A. L. McCormack and J. R. Yates (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. **5**, 976-989.
- Esakova, O. and A. S. Krasilnikov (2010) Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA (New York, N.Y.)*. **16**, 1725-47.
- Eveleigh, R. J., C. J. Meehan, J. M. Archibald and R. G. Beiko (2013) Being Aquifex aeolicus: Untangling a hyperthermophile's checkered past. *Genome biology and evolution*. **5**, 2478-97.
- Forti, F., P. Sabbattini, G. Sironi, S. Zangrossi, G. Deho and D. Ghisotti (1995) Immunity determinant of phage-plasmid P4 is a short processed RNA. *Journal of molecular biology*. **249**, 869–78.
- Frank, D. N., C. Adamidi, M. A. Ehringer, C. Pitulle and N. R. Pace (2000) Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA (New York, N.Y.)*. **6**, 1895-904.
- Gardiner, K. J., T. L. Marsh and N. R. Pace (1985) Ion dependence of the Bacillus subtilis RNase P reaction. *The Journal of biological chemistry*. **260**, 5415-9.
- Gobert, A., B. Gutmann, A. Taschner, M. Gößringer, J. Holzmann, R. K. Hartmann, W. Rossmann and P. Giege (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nature structural & molecular biology*. **17**, 740-4.
- Gobert, A., F. Pinker, O. Fuchsbaue, B. Gutmann, R. Boutin, P. Roblin, C. Sauter and P. Giege (2013) Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nature communications*. **4**, 1353.
- Gößringer, M. and R. K. Hartmann (2007) Function of heterologous and truncated RNase P proteins in Bacillus subtilis. *Molecular microbiology*. **66**, 801-13.
- Gößringer, M., R. Kretschmer-Kazemi Far and R. K. Hartmann (2006) Analysis of RNase P protein (rnpA) expression in Bacillus subtilis utilizing strains with suppressible rnpA expression. *Journal of bacteriology*. **188**, 6816-23.
- Griffiths, E. and R. S. Gupta (2004) Signature sequences in diverse proteins provide evidence for the late divergence of the Order Aquificales. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. **7**, 41-52.

- Gruber, T. M. and D. A. Bryant (1998) Characterization of the group 1 and group 2 sigma factors of the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* and the green non-sulfur bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Arch Microbiol.* **170**, 285-96.
- Gu, W., R. L. Hurto, A. K. Hopper, E. J. Grayhack and E. M. Phizicky (2005) Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(His) guanylyltransferase Thg1p leads to uncharged tRNA^{His} with additional m(5)C. *Molecular and cellular biology.* **25**, 8191-201.
- Guerrier-Takada, C. and S. Altman (1984) Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science (New York, N.Y.).* **223**, 285-6.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell.* **35**, 849-57.
- Gupta, R. S. (2000) The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **24**, 367-402.
- Gutmann, B., A. Gobert and P. Giege (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes & development.* **26**, 1022-7.
- Hall, T. A. and J. W. Brown (2002) Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA (New York, N.Y.).* **8**, 296-306.
- Harris, J. K., E. S. Haas, D. Williams, D. N. Frank and J. W. Brown (2001) New insight into RNase P RNA structure from comparative analysis of the archaeal RNA. *RNA (New York, N.Y.).* **7**, 220-32.
- Harris, M. E., J. M. Nolan, A. Malhotra, J. W. Brown, S. C. Harvey and N. R. Pace (1994) Use of photoaffinity crosslinking and molecular modeling to analyze the global architecture of ribonuclease P RNA. *The EMBO journal.* **13**, 3953-63.
- Hartmann, E. and R. K. Hartmann (2003) The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends in genetics : TIG.* **19**, 561-9.
- Hartmann, R. K. (1983) Rekonstitution von 50S ribosomalen Untereinheiten aus *Bacillus Stearothermophilus* mit verschiedenen 5S rRNS-Spezies, Freie Universität Berlin
- Hartmann, R. K., J. Heinrich, J. Schlegl and H. Schuster (1995) Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **92**, 5822-6.
- Himeno, H., T. Hasegawa, T. Ueda, K. Watanabe, K. Miura and M. Shimizu (1989) Role of the extra G-C pair at the end of the acceptor stem of tRNA(His) in aminoacylation. *Nucleic Acids Res.* **17**, 7855-63.
- Hollingsworth, M. J. and N. C. Martin (1986) RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Molecular and cellular biology.* **6**, 1058-64.
- Holzmann, J., P. Frank, E. Löffler, K. L. Bennett, C. Gerner and W. Rossmann (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell.* **135**, 462-74.
- Howard, M. J., W. H. Lim, C. A. Fierke and M. Koutmos (2012) Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **109**, 16149-54.
- Huber, R., T. Wilharm, D. Huber, A. Trincone, S. Burggraf, H. König, R. Reinhard, I. Rockinger, H. Fricke and K. O. Stetter (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., Represents a Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology.* **15**, 340-351.
- Humphrey, W., A. Dalke and K. Schulten (1996) VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics.* **14**, 33-8, 27-8.
- Ishii, R., O. Nureki and S. Yokoyama (2003) Crystal structure of the tRNA processing enzyme RNase PH from *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem.* **278**, 32397-404.
- Jarrous, N. and V. Gopalan (2010) Archaeal/eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic acids research.* **38**, 7885-94.
- Jovanovic, M., R. Sanchez, S. Altman and V. Gopalan (2002) Elucidation of structure-function relationships in the protein subunit of bacterial RNase P using a genetic complementation approach. *Nucleic acids research.* **30**, 5065-73.

- Kang, D., Y. Gho, M. Suh and C. Kang (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. **23**, 1511-1512.
- Kazantsev, A. V., A. A. Krivenko, D. J. Harrington, R. J. Carter, S. R. Holbrook, P. D. Adams and N. R. Pace (2003) High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 7497-502.
- Kelley, L. A. and M. J. Sternberg (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc.* **4**, 363-71.
- Kifusa, M., H. Fukuhara, T. Hayashi and M. Kimura (2005) Protein-protein interactions in the subunits of ribonuclease P in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. **69**, 1209-12.
- Kikovska, E., S. G. Svard and L. A. Kirsebom (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 2062-7.
- Kirsebom, L. A. and S. G. Svard (1994) Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *The EMBO journal*. **13**, 4870-6.
- Kitamura, A., T. Sengoku, M. Nishimoto, S. Yokoyama and Y. Bessho (2011) Crystal structure of the bifunctional tRNA modification enzyme MnmC from *Escherichia coli*. *Protein Science*. **20**, 1105-1113.
- Klenk, H. P., T. D. Meier, P. Durovic, V. Schwass, F. Lottspeich, P. P. Dennis and W. Zillig (1999) RNA polymerase of *Aquifex pyrophilus*: implications for the evolution of the bacterial rpoBC operon and extremely thermophilic bacteria. *J Mol Evol*. **48**, 528-41.
- Komine, Y., M. Kitabatake, T. Yokogawa, K. Nishikawa and H. Inokuchi (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**, 9223-7.
- Koutmou, K. S., J. J. Day-Storms and C. A. Fierke (2011) The RNR motif of *B. subtilis* RNase P protein interacts with both PRNA and pre-tRNA to stabilize an active conformer. *RNA (New York, N.Y.)*. **17**, 1225-35.
- Koutmou, K. S., N. H. Zahler, J. C. Kurz, F. E. Campbell, M. E. Harris and C. A. Fierke (2010) Protein-precursor tRNA contact leads to sequence-specific recognition of 5' leaders by bacterial ribonuclease P. *Journal of molecular biology*. **396**, 195-208.
- Krishna, S. S., I. Majumdar and N. V. Grishin (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic acids research*. **31**, 532-50.
- Kurz, J. C., S. Niranjana Kumari and C. A. Fierke (1998) Protein component of *Bacillus subtilis* RNase P specifically enhances the affinity for precursor-tRNA^{Asp}. *Biochemistry*. **37**, 2393-400.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaGrandeur, T. E., A. Huttenhofer, H. F. Noller and N. R. Pace (1994) Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between ribonuclease P RNA and tRNA. *The EMBO journal*. **13**, 3945-52.
- Lai, L. B., P. Bernal-Bayard, G. Mohannath, S. M. Lai, V. Gopalan and A. Vioque (2011) A functional RNase P protein subunit of bacterial origin in some eukaryotes. *Molecular genetics and genomics : MGG*. **286**, 359-69.
- Lai, L. B., P. P. Chan, A. E. Cozen, D. L. Bernick, J. W. Brown, V. Gopalan and T. M. Lowe (2010) Discovery of a minimal form of RNase P in *Pyrobaculum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 22493-8.
- Li, D., D. K. Willkomm, A. Schon and R. K. Hartmann (2007) RNase P of the *Cyanophora paradoxa* cyanelle: a plastid ribozyme. *Biochimie*. **89**, 1528-38.
- Li, Y. and S. Altman (2004a) In search of RNase P RNA from microbial genomes. *RNA (New York, N.Y.)*. **10**, 1533-40.
- Li, Y. and S. Altman (2004b) Polarity effects in the lactose operon of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*. **339**, 31-9.

- Lombo, T. B. and V. R. Kaberdin (2008) RNA processing in *Aquifex aeolicus* involves RNase E/G and an RNase P-like activity. *Biochemical and biophysical research communications*. **366**, 457-63.
- Lorenz, R., S. H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdissen, H. Tafer, C. Flamm, P. F. Stadler and I. L. Hofacker (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for molecular biology* : *AMB*. **6**, 26.
- Loria, A., S. Niranjankumari, C. A. Fierke and T. Pan (1998) Recognition of a pre-tRNA substrate by the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme. *Biochemistry*. **37**, 15466-73.
- Loria, A. and T. Pan (1996) Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P. *RNA (New York, N.Y.)*. **2**, 551-63.
- Loria, A. and T. Pan (1997) Recognition of the T stem-loop of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry*. **36**, 6317-25.
- Marchfelder, A. and A. Brennicke (1994) Characterization and partial purification of tRNA processing activities from potato mitochondria. *Plant physiology*. **105**, 1247-54.
- Marchfelder, A., W. Schuster and A. Brennicke (1990) In vitro processing of mitochondrial and plastid derived tRNA precursors in a plant mitochondrial extract. *Nucleic acids research*. **18**, 1401-6.
- Marck, C. and H. Grosjean (2002) tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *RNA (New York, N.Y.)*. **8**, 1189-232.
- Marszalkowski, M., J. H. Teune, G. Steger, R. K. Hartmann and D. K. Willkomm (2006) Thermostable RNase P RNAs lacking P18 identified in the Aquificales. *RNA (New York, N.Y.)*. **12**, 1915-21.
- Marszalkowski, M., D. K. Willkomm and R. K. Hartmann (2008) 5'-end maturation of tRNA in *aquifex aeolicus*. *Biol Chem*. **389**, 395-403.
- Martin, N. C., D. L. Miller, K. Underbrink and X. Ming (1985) Structure of a precursor to the yeast mitochondrial tRNA^{Metf}. Implications for the function of the tRNA synthesis locus. *The Journal of biological chemistry*. **260**, 1479-83.
- Marvin, M. C. and D. R. Engelke (2009) RNase P: increased versatility through protein complexity? *RNA Biol*. **6**, 40-2.
- Mattatall, N. R. and K. E. Sanderson (1996) *Salmonella typhimurium* LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences. *J Bacteriol*. **178**, 2272-8.
- Meierhoff, K., S. Felder, T. Nakamura, N. Bechtold and G. Schuster (2003) HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *The Plant cell*. **15**, 1480-95.
- Mili, S. and S. Pinol-Roma (2003) LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Molecular and cellular biology*. **23**, 4972-82.
- NCBI-Resource-Coordinators (2014) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. **42**, D7-17.
- Nicol, J. W., G. A. Helt, S. G. Blanchard, Jr., A. Raja and A. E. Loraine (2009) The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **25**, 2730-1.
- Niranjankumari, S., J. C. Kurz and C. A. Fierke (1998a) Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*. **26**, 3090-6.
- Niranjankumari, S., T. Stams, S. M. Crary, D. W. Christianson and C. A. Fierke (1998b) Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 15212-7.
- Odell, L., V. Huang, M. Jakacka and T. Pan (1998) Interaction of structural modules in substrate binding by the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *Nucleic acids research*. **26**, 3717-23.
- Orans, J., E. A. McSweeney, R. R. Iyer, M. A. Hast, H. W. Hellinga, P. Modrich and L. S. Beese (2011) Structures of human exonuclease 1 DNA complexes suggest a unified mechanism for nuclease family. *Cell*. **145**, 212-23.

- Orellana, O., L. Cooley and D. Soll (1986) The additional guanylate at the 5' terminus of *Escherichia coli* tRNA^{His} is the result of unusual processing by RNase P. *Molecular and cellular biology*. **6**, 525-9.
- Otto, C., S. Hoffmann, J. Gorodkin and P. F. Stadler (2011) Fast local fragment chaining using sum-of-pair gap costs. *Algorithms for molecular biology : AMB*. **6**, 4.
- Pan, T. (1995) Higher order folding and domain analysis of the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry*. **34**, 902-9.
- Pan, T., A. Loria and K. Zhong (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 12510-4.
- Pannucci, J. A., E. S. Haas, T. A. Hall, J. K. Harris and J. W. Brown (1999) RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**, 7803-8.
- Pavlova, L. V., M. Gößringer, C. Weber, A. Buzet, W. Rossmanith and R. K. Hartmann (2012) tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *Chembiochem*. **13**, 2270-6.
- Peck-Miller, K. A. and S. Altman (1991) Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*. **221**, 1-5.
- Pei, J. and N. V. Grishin (2014) PROMALS3D: multiple protein sequence alignment enhanced with evolutionary and three-dimensional structural information. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. **1079**, 263-71.
- Placido, A., F. Sieber, A. Gobert, R. Gallerani, P. Giege and L. Marechal-Drouard (2010) Plant mitochondria use two pathways for the biogenesis of tRNA^{His}. *Nucleic acids research*. **38**, 7711-7.
- R-CoreTeam (2013) R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing <http://www.R-project.org>
- Randau, L., I. Schroder and D. Soll (2008) Life without RNase P. *Nature*. **453**, 120-3.
- Rehm, H. (2006) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 5 ed., ELSEVIER, Spektrum Akademischer Verlag
- Reich, C., K. J. Gardiner, G. J. Olsen, B. Pace, T. L. Marsh and N. R. Pace (1986) The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P. Sequence, activity, and partial secondary structure. *The Journal of biological chemistry*. **261**, 7888-93.
- Reiter, N. J., A. Osterman, A. Torres-Larios, K. K. Swinger, T. Pan and A. Mondragon (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*. **468**, 784-9.
- Rivera-Leon, R., C. J. Green and B. S. Vold (1995) High-level expression of soluble recombinant RNase P protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **177**, 2564-6.
- Robertson, H. D., S. Altman and J. D. Smith (1972) Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosine transfer ribonucleic acid precursor. *The Journal of biological chemistry*. **247**, 5243-51.
- Rossmanith, W. (2012) Of P and Z: mitochondrial tRNA processing enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. **1819**, 1017-26.
- Russell, R. B. and G. J. Barton (1992) Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*. **14**, 309-23.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sambrook, J. a. R., D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schedl, P. and P. Primakoff (1973) Mutants of *Escherichia coli* thermosensitive for the synthesis of transfer RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **70**, 2091-5.
- Seif, E. and S. Altman (2008) RNase P cleaves the adenine riboswitch and stabilizes pbuE mRNA in *Bacillus subtilis*. *RNA (New York, N.Y.)*. **14**, 1237-43.
- Small, I. D. and N. Peeters (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends in biochemical sciences*. **25**, 46-7.

- Smith, D., A. B. Burgin, E. S. Haas and N. R. Pace (1992) Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J Biol Chem.* **267**, 2429-36.
- Smith, D. and N. R. Pace (1993) Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry.* **32**, 5273-81.
- Spitzfaden, C., N. Nicholson, J. J. Jones, S. Guth, R. Lehr, C. D. Prescott, L. A. Hegg and D. S. Eggleston (2000) The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *Journal of molecular biology.* **295**, 105-15.
- Stams, T., S. Niranjanakumari, C. A. Fierke and D. W. Christianson (1998) Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science (New York, N.Y.).* **280**, 752-5.
- Stark, B. C., R. Kole, E. J. Bowman and S. Altman (1978) Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **75**, 3717-21.
- Steitz, T. A. and J. A. Steitz (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **90**, 6498-502.
- Studier, F. W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology.* **219**, 37-44.
- Sun, L., F. E. Campbell, N. H. Zahler and M. E. Harris (2006) Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P. *EMBO J.* **25**, 3998-4007.
- Svard, S. G., U. Kagardt and L. A. Kirsebom (1996) Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA (New York, N.Y.).* **2**, 463-72.
- Swanson, R. V. (2001) Genome of *Aquifex aeolicus*. *Methods in enzymology.* **330**, 158-69.
- Symmons, M. F., G. H. Jones and B. F. Luisi (2000) A duplicated fold is the structural basis for polynucleotide phosphorylase catalytic activity, processivity, and regulation. *Structure.* **8**, 1215-26.
- Tallsjo, A. and L. A. Kirsebom (1993) Product release is a rate-limiting step during cleavage by the catalytic RNA subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic acids research.* **21**, 51-7.
- Taschner, A., C. Weber, A. Buzet, R. K. Hartmann, A. Hartig and W. Rossmanith (2012) Nuclear RNase P of *Trypanosoma brucei*: a single protein in place of the multicomponent RNA-protein complex. *Cell reports.* **2**, 19-25.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson and D. G. Higgins (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.].* **Chapter 2**, Unit 2.3.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nature structural & molecular biology.* **12**, 313-319.
- Tsai, H. Y., D. K. Pulukkunat, W. K. Woznick and V. Gopalan (2006) Functional reconstitution and characterization of *Pyrococcus furiosus* RNase P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **103**, 16147-52.
- Vilardo, E., C. Nachbagauer, A. Buzet, A. Taschner, J. Holzmann and W. Rossmanith (2012) A subcomplex of human mitochondrial RNase P is a bifunctional methyltransferase--extensive moonlighting in mitochondrial tRNA biogenesis. *Nucleic acids research.* **40**, 11583-93.
- Vioque, A. (2010) *RNase P from Organelles*, in: F. Liu, S. Altman (Editoren) *Ribonuclease P*, Springer, New York
- Vioque, A., J. Arnez and S. Altman (1988) Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **202**, 835-48.
- Walker, S. C., M. C. Marvin and D. R. Engelke (2010) *Eukaryote RNase P and RNase MRP*, in: F. Liu, S. Altman (Editoren) *Ribonuclease P*, Springer, New York
- Wang, C., B. W. Sobral and K. P. Williams (2007) Loss of a universal tRNA feature. *Journal of bacteriology.* **189**, 1954-62.

- Wang, M. J., N. W. Davis and P. Gegenheimer (1988) Novel mechanisms for maturation of chloroplast transfer RNA precursors. *The EMBO journal*. **7**, 1567-74.
- Wang, M. J. and P. Gegenheimer (1990) Substrate masking: binding of RNA by EGTA-inactivated micrococcal nuclease results in artifactual inhibition of RNA processing reactions. *Nucleic acids research*. **18**, 6625-31.
- Warnecke, J. M., J. P. Furste, W. D. Hardt, V. A. Erdmann and R. K. Hartmann (1996) Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd(2+)-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**, 8924-8.
- Warnecke, J. M., R. Held, S. Busch and R. K. Hartmann (1999) Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular biology*. **290**, 433-45.
- Wassarman, K. M. (2007) 6S RNA: a regulator of transcription. *Molecular microbiology*. **65**, 1425-1431.
- Waugh, D. S., C. J. Green and N. R. Pace (1989) The design and catalytic properties of a simplified ribonuclease P RNA. *Science (New York, N.Y.)*. **244**, 1569-71.
- Waugh, D. S. and N. R. Pace (1990) Complementation of an RNase P RNA (rnpB) gene deletion in *Escherichia coli* by homologous genes from distantly related eubacteria. *Journal of bacteriology*. **172**, 6316-22.
- Wegscheid, B., C. Condon and R. K. Hartmann (2006) Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences. *EMBO reports*. **7**, 411-7.
- Wegscheid, B. and R. K. Hartmann (2006) The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P in vivo. *RNA (New York, N.Y.)*. **12**, 2135-48.
- Wegscheid, B. and R. K. Hartmann (2007) In vivo and in vitro investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic acids research*. **35**, 2060-73.
- William Studier, F., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff and V. G. David (1990) [6] Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, pp 60-89, Academic Press
- Willkomm, D. K., R. Feltens and R. K. Hartmann (2002) tRNA maturation in *Aquifex aeolicus*. *Biochimie*. **84**, 713-22.
- Willkomm, D. K. and R. K. Hartmann (2005) 6S RNA - an ancient regulator of bacterial RNA polymerase rediscovered. *Biological chemistry*. **386**, 1273-1277.
- Willkomm, D. K., J. Minnerup, A. Huttenhofer and R. K. Hartmann (2005) Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic acids research*. **33**, 1949-60.
- Wilson, R. C., C. J. Bohlen, M. P. Foster and C. E. Bell (2006) Structure of Pfu Pop5, an archaeal RNase P protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 873-8.
- Yusuf, D., M. Marz, P. F. Stadler and I. L. Hofacker (2010) Bcheck: a wrapper tool for detecting RNase P RNA genes. *BMC genomics*. **11**, 432.

7.3 Eigene Publikationen und Tagungsbeiträge

7.3.1 Veröffentlichungen

Lechner*, M., Nickel*, A. I., Wehner*, S., Riege, K., Wieseke, N., Beckmann, B. M., Hartmann, R. K. and Marz, M.

Genomewide comparison and novel ncRNAs of *Aquificales*. *BMC Genomics*. Im Druck.

* geteilte Erstautorschaft

Soerensen, J., Pekcec, A., Fuest, C., Nickel, A. and Potschka, H (2009)

Pyrrolidine dithiocarbamate protects the piriform cortex in the pilocarpine status epilepticus model. *Epilepsy Research*. **87** (2), 177-183

7.3.2 Posterpräsentationen

6. Tagung der GBM-Studiengruppe "RNA-Biochemie", 2010, Hohenwart

Nickel, A. I., Marz, M., Beckmann, B. M., Sharma, C. M., Vogel, J. and Hartmann, R. K.

Transcriptome analysis: antisense transcripts and small non-coding RNAs
in *Aquifex aeolicus*

7. Tagung der GBM-Studiengruppe "RNA-Biochemie", 2012, Bonn

Nickel, A. I., Marz, M., Beckmann, B. M., Sharma, C. M., Vogel, J. and Hartmann, R. K.

Transcriptome analysis: antisense transcripts and small non-coding RNAs
in *Aquifex aeolicus*

7.4 Genomewide comparison and novel ncRNAs of *Aquificales*

Genomewide comparison and novel ncRNAs of *Aquificales*.

Lechner, M., Nickel, A. I., Wehner, S., Riege, K., Wieseke, N., Beckmann, B. M., Hartmann, R. K. and Marz, M.

BMC Genomics. Im Druck.

RESEARCH

Genomewide comparison and novel ncRNAs of Aquificales

Marcus Lechner^{1†}, Astrid I. Nickel^{1†}, Stefanie Wehner^{2†}, Konstantin Riege², Nicolas Wieseke³, Benedikt M. Beckmann⁴, Roland K. Hartmann¹ and Manja Marz^{2*}

Abstract

The *Aquificales* are a diverse group of thermophilic bacteria that thrive in terrestrial and marine hydrothermal environments. They can be divided into the families *Aquificaceae*, *Desulfurobacteriaceae* and *Hydrogenothermaceae*. Although eleven fully sequenced and assembled genomes are available, only little is known about this taxonomic order in terms of RNA metabolism.

In this work, we compare the available genomes, extend their protein annotation, identify regulatory sequences, annotate non-coding RNAs (ncRNAs) of known function, predict novel ncRNA candidates, show idiosyncrasies of the genetic decoding machinery, present two different types of transfer-messenger RNAs and variations of the CRISPR systems. Furthermore, we performed a phylogenetic analysis of the *Aquificales* based on entire genome sequences, and extended this by a classification among all bacteria using 16S rRNA sequences and a set of orthologous proteins.

Combining several *in silico* features (e.g. conserved and stable secondary structures, GC-content, comparison based on multiple genome alignments) with an *in vivo* dRNA-seq transcriptome analysis of *Aquifex aeolicus*, we predict roughly 100 novel ncRNA candidates in this bacterium.

Keywords: Aquificales; Thermophiles; ncRNA; Aquificaceae; Desulfurobacteriaceae; Hydrogenothermaceae

1 Introduction

Aquificales are gram-negative, non-sporulating bacteria that are thermophilic to hyperthermophilic [1, 2], living in terrestrial and marine hot springs. They are autotrophs that primarily fix carbon by the tricarboxylic acid (TCA) cycle [3, 4, 5]. The hyperthermophile *A. aeolicus*, living under extreme temperatures of up to 95°C, has been proposed to have adopted 10% of its protein-coding genes by horizontal gene transfer [6, 7] from Archaea. Accumulation of all the special properties of thermophiles (also referred to as accumulation profiles [8]) are rarely understood. Special protein-protective mechanisms have been analyzed [9, 10], but we are far away from a comprehensive understanding of the molecular biology of extremophilic bacteria. Beyond idiosyncratic features of *Aquificales* genomes, our interest focussed on their transcriptomes. Experimentally, we performed a deep sequencing analysis on the model hyperthermophile *A. aeolicus* with the primary goal of identifying novel ncRNAs candidates. ncRNAs are known to have various functions in all domains of life. Apart from their gen-

eral importance as gene expression regulators [11, 12, 13], ncRNAs are involved in processing [14] and translation [15] of other genes, in defending genomes from viral invasion [16], in shaping and maintenance of bacterial chromosome architecture [17], and they can even be multifunctional [18, 19]. According to 16S rRNA analysis, the *Aquificales* constitute the most deeply rooted bacterial group [20]. However, protein-based phylogenetic reconstructions are not in line with this model [21, 22, 23, 24, 25, 26].

We compared the genomes of the three *Aquificales* families, i.e. *Aquificaceae*, *Hydrogenothermaceae* and *Desulfurobacteriaceae*. We have extended the protein annotation of the mentioned *Aquificales* and reconstructed the phylogenetic position of these species based on 16S rRNAs as well as on a set of orthologous proteins. Moreover, we have identified ncRNAs based on known homologs and present a complete set of novel ncRNA candidates based on sequence analyses and deep sequencing data obtained for *A. aeolicus*. For selected ncRNA loci, we provide independent experimental evidence for their expression.

*Correspondence: manja@uni-jena.de

²Friedrich-Schiller-University Jena, Faculty of Mathematics and Computer Science, Leutragraben 1, 07743, Jena, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

[†]Equal contributor

2 Materials and Methods

2.1 Genomes

We analyzed the genomes of the following species split into their respective families:

- *Aquificaceae*: *Aquifex aeolicus* VF5 (AAE), *Hydrogenivirga* sp. 128-5-R1-1 (HVI), *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 (HTH), *Thermocrinis ruber* (TRU), *Thermocrinis albus* DSM 14484 (TAL), *Hydrogenobaculum* sp. Y04AAS1 (HBA),
- *Hydrogenothermaceae*: *Sulfurihydrogenibium* sp. YO3AOPN (SSP), *Sulfurihydrogenibium azorense* Az-Fu1 (SAZ), *Persephonella marina* EX-H1 (PMA), and
- *Desulfurobacteriaceae*: *Desulfobacterium thermolithotrophum* DSM 11699 (DTH), and *Thermovibrio ammonificans* HB-1 (TAM).

Accession numbers and sources of genomes are listed in the Supplemental Material. Whole-genome alignments were constructed using Pomago (v.1.0) [27] and TBA (v.1.1.2) (threaded blockset aligner) [28] with default parameters. Pomago alignments were computed separately for each species as reference. The TBA alignment was projected to each of the reference genomes. Coverage, alignment quality (Weighted sum-of-pairs score – WSoP [29]) and gap ratio are given in Table 1.

2.2 Extension of protein annotation

We used BacProt (publication in progress, see [30] for details) to complement the present annotation of protein-coding genes for each *Aquificales* genome. It uses a database of groups of orthologous protein-coding genes present in most bacteria [31]. Matches in the genome of interest are annotated, and species-specific features like codon usage, Shine-Dalgarno sequences, Pribnow box motifs and Rho-independent terminators are used to predict additional protein-coding genes. To actually achieve a *de novo* annotation, we excluded all *Aquificales* genes from the reference database. Alternative start codons like ATT and CTG were considered as well [32, 33, 34]. Re-annotated and previously annotated proteins (genomic positions and sequences) and statistics (mono-/di-nucleotide distribution, position and occurrence of Shine-Dalgarno sequence motifs and Pribnow boxes) for each species are provided in the Supplemental Material.

2.3 Annotation of ncRNAs by homology

We used GORAP (v.1.0, publication in progress) to annotate ncRNAs in the following manner: transfer-RNAs (tRNAs) were detected by tRNAscan-SE (v.1.3.1) [35] with the option *-B* for bacteria. Splitted tRNAs were searched using SPLITS (v.1.1) [36]. By applying ARAGORN (v.1.2), we searched for tRNAs containing introns [37]. Searches for RNase P RNA were conducted with Bcheck (v.1.0) [38]. For the detection of putative CRISPR loci, crt (v1.2) [39] and CRISPRfinder [40] were used. We searched for *cas*

protein genes by blast (v.2.2.26, E-value $\leq 10^{-4}$) [41] based on known *cas* genes (downloaded from UniProt (downloaded Jan. 2013) [42]).

To find further ncRNAs, we used blast and Infernal (v.1.1rc2) [43]. Seed sequences from the Rfam (v.11.0) database [44] and European Ribosomal RNA Database [45] were used as query with an E-value ≤ 0.001 for blast and the Rfam-provided family specific noise cutoff^[1] for Infernal.

ncRNAs expected to escape from detection (e.g. 6S RNA) were searched in a second step with rnabob [46] for short motif search in combination with RNAsubopt, RNAduplex, RNAcofold, RNAalifold and RNAup from the RNA Vienna Package (v.2.0) [47, 48, 49, 50]. For verification, we aligned candidates with ClustalW (v.2.0.10) [51] or Locarinate (v.1.7.7.1) [52]. Stockholm alignments were adjusted by hand in the Emacs Ralee mode [53].

Resulting stockholm alignments are supplied in the Supplemental Material in the General Feature Format (gff) as well as in Fasta (fa) and Stockholm (stk) formats.

2.4 Phylogenetic reconstruction

Protein-based phylogeny was performed based on the official NCBI [54] annotations for 42 bacteria shown in the Supplemental Material. In addition to eleven *Aquificales* species, we included two Archaea as outgroup and a wide phylogenetic range of 29 bacterial species representing all bacterial clades.

Protein sequences were clustered using Proteinortho [31] in the blastp+-mode, thus performing a pairwise all-against-all comparison of sequences from different species to derive orthologous relationships. Whenever an orthologous group did not have a member in a certain species, we applied tblastn to the respective genome to complement for potentially incomplete annotations. The highest scoring alignment to an ORF above a fairly high E-value $\leq 10^{-20}$ was added to the initial protein annotation. Finally, Proteinortho was applied again using the expanded annotation.

For a high resolution phylogeny within the *Aquificales*, we created a whole genome alignment using Pomago. The alignment was analyzed using RAXML (v.7.4.2) [55] with a GAMMA model of rate heterogeneity with an estimate on the proportion of invariable sites and 100 rapid bootstraps.

In an additional phylogenetic analysis we used single-copy orthologous proteins present in at least 50% of all species in the set (189 groups in 42 species). Each protein group was aligned separately using dialign-tx [56]. Both ends of the group's alignments were cropped to remove leading and tailing gaps. The remaining sequences

^[1]Noise cutoff is the highest observed false positive bit score for a potential gene which does not belong to the seed model.

were concatenated resulting in a 57,260 aa long alignment and applied to RAxML using the LG substitution model [57] as well as the GAMMA model of rate heterogeneity with 100 rapid bootstraps.

The 16S rRNA-based phylogeny was computed with Mafft (v.7.017) [58] using the L-INS-i method with 1000 iterations. We used different approaches: (1) Neighbor Joining with the Kimura correction model [59] (1000 bootstraps), (2) Bayesian inference with MrBayes (v.3.1.2) [60] with default parameters, (3) Maximum likelihood with RAxML (v.7.2.8) [61] (200 bootstraps) with the base substitution models (3a) GTRGAMMA (most accurate, 1000 steps) and (3b) GTRCAT for the bootstrapping phase. For all previously mentioned methods the Archaea *Methanobacterium* sp. AL-21 and *Archaeoglobus fulgidus* were used as out-group. As state of the art, we have estimated a tree with (4) Sate (v.2.2.5) [62] (200 iterations). Related sequences were aligned with Mafft and subsequently merged by Muscle (v.3.7) [63]. The tree was computed using RAxML.

2.5 dRNA-seq of *A. aeolicus* total cellular RNA

Transcriptome analysis of *A. aeolicus* was based on cDNA libraries from a differential deep sequencing approach (dRNA-seq) [64, 65]. *A. aeolicus* cells, provided by M. Thomm and R. Huber (Regensburg, Germany), were grown for 1 day (late exponential phase) and harvested as described [66]. For preparation of total cellular RNA, we used the hot phenol method [67]: cell pellets were resuspended in extraction buffer (10 mM sodium acetate pH 4.8, 150 mM sucrose) and incubated for 10 min at room temperature with 0.1 volumes of lysozyme (20 mg/ml, Roth, Karlsruhe, Germany). SDS was added to a final concentration of 1% followed by vigorous vortexing. After addition of 1 volume phenol (preheated to 65°C) and vortexing, the mixture was incubated for 5 min at 65°C, then cooled on ice for 5 min, and centrifuged for 30 min at 4°C and 8200 g. Phenol extraction was repeated, followed by chloroform (1+1) extraction and ethanol precipitation. Finally, the DNA was digested with 10 U Turbo DNase (Ambion, Austin, USA) for 30 min at 37°C, followed by addition of another 10 U DNase and incubation for another 30 min at 37°C. Subsequently, the RNA was subjected to phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. After redissolving the RNA in double-distilled water, its concentration was determined by UV spectroscopy. Before cDNA library construction, the RNA was split into two fractions; one fraction was treated with Terminator 5' P-dependent exonuclease (Epicentre, Madison, USA) for depletion of transcripts carrying a 5'-monophosphate. Both fractions were treated with Tobacco Acid Phosphatase (TAP) before 5'-linker ligation, poly(A) tailing and conversion into cDNA (vertis Biotechnologie AG). The cDNA libraries were then sequenced on a Roche FLX sequencer and resulted in the (–)-library with 25,816 reads and the (+)-library (33,697 reads) containing the enriched primary transcripts.

2.6 Detection of novel ncRNAs

We used the IGB (Integrated Genome Browser) [68] to visualize the following features of *A. aeolicus*: (1) nucleotide sequence; (2) local GC-content (for each nucleotide 15 nt on both sides were included for the calculation of GC-content); (3) protein genes annotated by NCBI [69] and BacProt; (4) locally stable secondary structures: calculation was performed with RNAfold with options *-d2* and *-L120* for both strands with a maximum base-pair span of 120 nucleotides. Sequences with local structures of fewer than 50 nt were discarded. For the prediction of thermodynamically stable RNA structures, each sequence was shuffled 1000 times while preserving the dinucleotide frequencies; to classify extraordinarily stable RNA secondary structures, we chose to use a Z-score cutoff of -3.0 (\sim top 5% of stable structures); (5) conserved regions among the *Aquificales*: with default parameters of TBA and Pomago we aligned 11 genomes; the TBA alignment was projected to each of the reference genomes; coverage, WSoP and gap ratio are given in Table 1; (6) novel ncRNAs: novel ncRNA candidates were predicted using RNAz. We used *rnazWindow.pl --min-seqs=4* and *RNAz -n -b -p 0.5* on the alignments of Pomago and TBA. As *rnazWindow.pl* assumes lower case nucleotides to be masked, the alignments were converted to upper case letters beforehand; (7) dRNA-seq: cDNA libraries were mapped with *segemehl* (v.0.0.9.3) [70] applying the parameters *-m 12 -D 1 -e 2 -p 4 -X 8 -A 90 -E 5.0*.

2.7 Northern blot experiments

Total RNA preparation Total RNA was prepared from cell pellets using the hot phenol method as described [71].

Positive and negative controls The positive and the negative controls for the Northern blot experiments were synthesized by *in vitro* transcription using the “TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit” (Thermo Scientific), according to the protocol supplied by the manufacturer. PCR products generated with the “Long PCR Enzyme Mix” (Thermo Scientific, Germany) served as templates for *in vitro* transcription. As positive controls for the antisense tRNA blots, chemically synthesized RNA oligonucleotides from “Integrated DNA Technologies” (IDT, Belgium) were used (for sequences, see Supplemental Material). RNA oligonucleotides were 5'-phosphorylated before gel electrophoresis. The *in vitro* transcribed full-length sense tRNAs (generated from PCR products) were used as negative controls for the Northern blots of antisense tRNAs.

Digoxigenin and LNA probes For the Northern blot detection internally digoxigenin-labeled probes were transcribed using the DIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics, Germany) as described [71]. The antisense tRNA

transcripts were detected with chemically synthesized 5'-digoxigenin-labeled DNA/LNA mixmer probes (Exiqon, Denmark; for sequences, see Supplemental Material).

5'-Phosphorylation of RNA oligonucleotides 67 ng/ μ l RNA oligonucleotide, 2.5 mM DTT, 2 mM ATP and 10 U T4 polynucleotide kinase (T4 PNK; Thermo Scientific) were incubated in 1x T4 PNK buffer (Thermo Scientific) in a volume of 15 μ l for 1 h at 37°C, followed by transfer to and storage at -20°C.

Electrophoresis RNAs were separated on 8% or 10% denaturing (8 M urea) PAA gel with 1x TBE as electrophoresis buffer [71].

Blotting, crosslinking, hybridization and detection RNA blotting, hybridization (EDC crosslinking or baking at 80°C for 40 min) and immunological detection were performed as described [71], except that RNA blotting was carried out at 0.36 mA/cm² overnight. Pre-hybridization and hybridization were done using 12 ml hybridization solution. 3.5 μ l of *in vitro* transcribed, internally digoxigenin-labeled probe were added for overnight hybridization. 300 pmol of chemically synthesized, 5'-digoxigenin-labeled DNA/LNA mixmer probe were used for Northern detection of antisense tRNAs. Blotted membranes were stored at room temperature.

In vitro transcripts, probes and primers Further details of *in vitro* transcripts, probes and primers are listed in the Supplemental Material.

3 Results and Discussion

3.1 Genome analysis – general observations

The genomes of the *Aquificales* range from 1.50 Mb (*T. albus*) to 1.98 Mb (*P. marina*), thus being at the lower limit of bacterial genomes ranging in size from 0.14 to 14.38 Mb with a mean of \sim 4 Mb^[2]. The current annotation file of *Hydrogenivirga* sp. contains 3.04 Mb, which is considerably larger than the genome size of the other *Aquificales*, which might be an assembly artefact as discussed later.

Aquificales are known to be AT-rich with a GC-content of about 43% [69, 72]. In *Hydrogenobaculum* sp., *Sulfurihydrogenibium* sp. and *S. azorense* even only one-third of the nucleotides are guanine or cytosine. For *T. ammonificans* an atypically high GC-content of more than 50% was observed.

Between 6.5% (*S. azorense*) and 28.5% (*Hydrogenobaculum* sp.) of the genomes were found to be unique to each member bacterium (Table 1). The comparatively low coverage of *Hydrogenivirga* sp. is due to the currently assembled

Table 2 Protein annotations obtained with NCBI (first column) and those identified with BacProt (second column) lead to an extended current annotation of Aquificales (last column). In the second lines, hypothetical proteins were removed. All gff files are available in the Supplemental Material. Species abbreviation as in Table 1.

	NCBI	BacProt	Equal	Start shifted	End shifted	NCBI only	BacProt only	Extended
AAE	1560 897	1255 685	954 475	116 51	124 54	366 317	62 106	1622 1003
DTH	1513 1115	1383 744	1092 561	85 57	105 74	231 423	102 53	1615 1168
HBA	1629 1063	1340 672	1040 500	119 62	126 68	344 433	56 43	1685 1106
HTH	1893 1343	1361 749	1069 594	111 62	129 84	584 603	53 10	1946 1353
PMA	2051 1494	1593 806	1286 629	129 84	122 76	514 705	57 18	2108 1512
SAZ	1723 1321	1427 741	1190 601	90 50	99 73	344 597	49 18	1772 1339
SSP	1722 1145	1532 752	1225 573	76 38	108 70	313 464	124 72	1846 1217
TAL	1593 1144	1145 691	903 514	93 59	127 85	470 486	23 34	1616 1178
TAM	1814 1176	1243 748	1014 575	90 60	100 63	610 478	41 51	1855 1227
HVI	3808 1960	2327 933	1606 607	415 143	684 334	1122 876	174 139	3872 2099

genome being almost twice as long as those of other *Aquificales*. 10.5% to 13.0% of the Pomago alignment, resp. 8.4% to 9.6% of the TBA alignment, consist of gaps. According to the WSoP each nucleotide from the alignment is conserved on average in slightly less than half of the other 10 species (4.43 to 5.09 out of 11 and 3.81 to 4.91 out of 11, for Pomago and TBA, respectively) indicating that the genomes diverged relatively fast. Genomic rearrangements among the *Aquificales*, underlining the diversity, can be seen in an overview of the Pomago alignment in the Supplemental Material.

3.2 Extended annotation of proteins

We extended the original NCBI annotation of proteins of the *Aquificales de novo* using BacProt, revealing a number of additional proteins (Table 2). Since a large fraction of proteins are hypothetical or of unknown function, we added for each species a second row which exclusively depicts those with an associated function. The annotations of NCBI and BacProt were merged to generate a combined annotation of protein genes in the *Aquificales*.

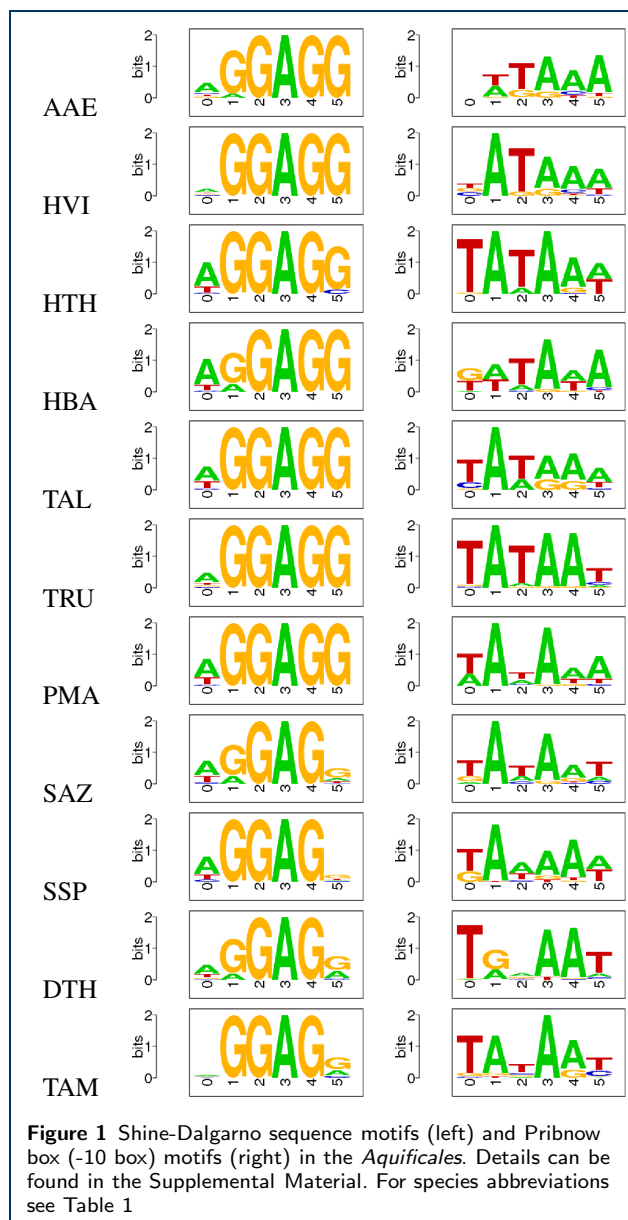
We added between 0.7% of *H. thermophilus* and 10.6% of *A. aeolicus* protein-coding genes to the NCBI annotation.

For all proteins annotated by BacProt, we extracted the Shine-Dalgarno and Pribnow box (-10 box) motifs (see Fig. 1) in order to facilitate the assignment of novel *Aquificales*-specific proteins. The Shine-Dalgarno sequence is rather conserved (GGAGG, but always NGAGN). In contrast, the Pribnow box is recognizable but less conserved, indicating more sequence variations among promoters. With

^[2]<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi> (accessed 2013-08-05)

Table 1 General genome features of the Aquificales. The genome size is given as the total number of nucleotides in the assembly. Multiple sequence alignments (MSA) were performed by Pomago and TBA. RNAz was applied to the Pomago- and TBA-derived MSAs. De novo protein annotation is based on statistics from BacProt, neglecting previously reported proteins for Aquificales. Annotation of ncRNAs shows the statistics for identified ncRNAs of known function. Details of CRISPR cassettes, number of repeats and associated proteins can be found in Fig. 8 and in the Supplemental Material. TmRNAs are classified into two types (Fig. 5). The phylogenetic tree shown at the top of the table is based on the whole genome as well as 16S rRNA analysis of the 11 Aquificales species. It reproduces the results presented in [73, 74, 75]. For further information, see Supplemental Material. AAE – *A. aeolicus*, HVI – *Hydrogenivirga* sp., HTH – *H. thermophilus*, HBA – *Hydrogenobaculum* sp., TAL – *T. albus*, TRU – *T. ruber*, PMA – *P. marina*, SAZ – *S. azorense*, SSP – *Sulfurihydrogenibium* sp., DTH – *D. thermolithotrophum*, TAM – *T. ammonificans*, RS – *Riboswitch*, WSoP – *Weighted sum-of-pairs score* [29], * denotes the *Hydrogenivirga* sp. genome of unfinished assembly.

Species	AAE	HVI*	HTH	TAL	TRU	HBA	PMA	SAZ	SSP	DTH	TAM
General Features											
Optimal temperature	85°C	72°C	70-75°C	80°C	80°C	58-73°C	73°C	68°C	70°C	70°C	75°C
Genome size (Mb)	1.59	3.04	1.74	1.50	1.52	1.56	1.98	1.64	1.84	1.54	1.76
GC-content	43.3	43.8	44.0	46.9	45.2	34.8	37.1	32.8	32.0	34.9	52.1
MSA Coverage (Mb)											
Pomago	1.45	1.72	1.52	1.40	1.41	1.28	1.55	1.51	1.62	1.36	1.40
	(90.9%)	(56.5%)	(87.4%)	(93.0%)	(92.8%)	(81.9%)	(78.0%)	(91.8%)	(88.1%)	(87.9%)	(79.3%)
TBA	1.38	2.02	1.52	1.40	1.40	1.15	1.57	1.52	1.55	1.31	1.36
	(86.5%)	(66.5%)	(87.3%)	(93.3%)	(91.7%)	(73.9%)	(78.9%)	(92.9%)	(84.5%)	(84.8%)	(77.3%)
WSoP											
Pomago	4.90	4.54	4.62	4.90	5.06	5.09	4.55	4.59	4.54	4.43	4.43
TBA	4.59	3.81	4.35	4.59	4.60	4.91	4.10	4.00	3.96	4.07	4.10
gap ratio											
Pomago	0.130	0.108	0.109	0.105	0.105	0.125	0.120	0.130	0.120	0.118	0.105
TBA	0.091	0.090	0.089	0.092	0.093	0.096	0.093	0.089	0.091	0.085	0.084
de novo Protein Annotation											
Homologous ORFs	685	933	749	695	695	672	806	741	752	744	748
Predicted ORFs	570	1394	612	455	499	668	787	686	780	639	495
Min. length (aa)	40	40	40	45	40	40	40	40	40	40	40
Max. length (aa)	1574	1535	1566	1566	1647	1563	1576	1605	1579	1470	1490
Start codons											
TTG (%)	6.53	8.77	5.22	4.61	8.04	9.03	13.25	14.65	14.88	13.81	12.55
ATG (%)	82.71	78.51	86.55	84.43	83.25	86.34	83.24	79.12	79.18	76.64	67.34
GTG (%)	10.76	12.46	8.23	10.87	8.54	4.63	3.52	6.17	5.94	9.33	20.03
Stop codons											
TAA (%)	49.24	39.32	39.09	32.35	40.20	50.45	50.97	60.62	56.46	58.06	46.98
TAG (%)	13.86	18.74	15.43	12.00	15.24	14.55	20.72	16.05	14.95	19.23	26.07
TGA (%)	36.89	41.94	45.48	55.39	44.56	35.00	28.31	23.34	28.59	22.70	26.95
GC-content	44	46.6	44.4	47.1	45.6	35.2	37.6	33.1	32.3	35.1	52.4
ncRNA Annotation											
5S rRNA	2	3	1	1	2	2	2	2	3	2	3
16S rRNA	2	2	1	1	2	2	2	2	3	2	3
23S rRNA	2	2	1	1	2	2	2	2	3	2	3
tRNA	44	57	44	44	44	45	40	39	40	43	46
RNase P	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
6S RNA	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1?	1?
tmRNA	1(A)	2(A,B)	1(A)	1(A)	1(A)	1(A)	1(B)	1(B)	1(B)	1(B)	1(B)
SRP RNA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TPP RS	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
MOCO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Cobalamin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
crcB	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
CRISPR	6	12	1	4	6	1	4	13	4	1	8
cas genes	1	1(+1)	1	1	2	0	1(+1)	3	1	0	(1)
GC-content	65.8	62.6	61.2	63.1	63.5	54.7	60.7	57.7	57.2	61.7	63.6
RNAz Coverage (nt, $P \geq 0.5$)											
Pomago	13574	15712	13317	14213	12476	12533	12067	11960	12356	9969	11377
	(0.85%)	(0.51%)	(0.76%)	(0.94%)	(0.81%)	(0.80%)	(0.60%)	(0.72%)	(0.67%)	(0.64%)	(0.64%)
TBA	25686	29909	22950	21126	20751	21702	22765	14022	18612	17287	20367
	(1.61%)	(0.98%)	(1.31%)	(1.40%)	(1.36%)	(1.39%)	(1.14%)	(0.85%)	(1.01%)	(1.12%)	(1.15%)
RNAz Coverage (nt, $P \geq 0.9$)											
Pomago	4600	5091	4192	5394	3862	3234	4038	3828	4430	4188	2990
	(0.28%)	(0.16%)	(0.24%)	(0.35%)	(0.25%)	(0.20%)	(0.20%)	(0.23%)	(0.24%)	(0.27%)	(0.16%)
TBA	14632	16806	11833	10614	10976	13341	14761	6067	11072	10502	14462
	(0.91%)	(0.55%)	(0.67%)	(0.70%)	(0.72%)	(0.85%)	(0.74%)	(0.36%)	(0.60%)	(0.68%)	(0.82%)



the appropriate covariance models we searched for species-specific novel proteins and listed them as predicted proteins in the Supplemental Material.

An overview of the codon usage of *A. aeolicus* is shown in Table 3. Complete data on all codon usage tables and mono/dinucleotide distributions are provided in the Supplemental Material. We observe a disproportionate usage of certain triplets: isoleucine is mostly (63%) encoded by AUA, tyrosine by UAC (82%) and histidine by CAC (84%). The four arginine codons encoded with a cytosine at first position of the triplet are rarely used, compared to the two adenine-containing triplets (9%/91%).

3.3 Homology search and annotation of known ncRNAs
A search for ncRNA candidates with RNaz [76] predicted a relatively constant fraction of the genome to code for ncRNAs (between 0.36% for *S. azorensis* and 0.91% for *A. aeolicus*). Besides the well-known and described rRNAs and tRNAs, only a handful of other wide-spread ncRNAs were detected (Table 1).

rRNA operons Most of the *Aquificales* genomes have two rRNA operons (Table 1). *H. thermophilus* and *T. albus* appear to harbor only one operon. The genomes of *T. ammonificans* and *Sulfurihydrogenibium sp.* contain three operons, whereas *Hydrogenivirga sp.* appears to have two 16S, two 23S and three 5S rRNA genes.

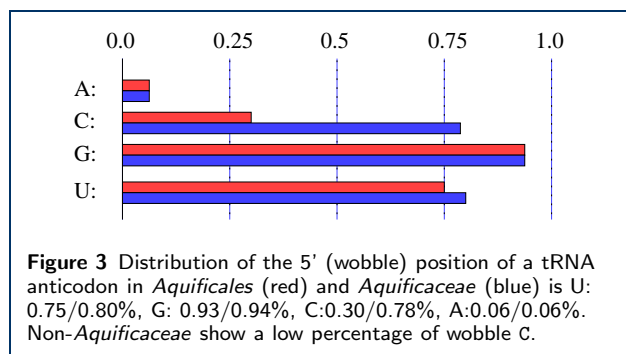
tRNAs With the exception of *Hydrogenivirga sp.* (see below), tRNAscan identified between 39 (*S. azorensis*) and 46 tRNAs (*T. ammonificans*) per *Aquificales* species. With SPLITS and ARAGORN no splitted tRNAs were found.

All possible codons are utilized in the *Aquificales* (see Table 3 for *A. aeolicus*, and Supplemental Material for other *Aquificales*), but the number of tRNA genes is reduced to a minimum in contrast to reference bacteria such as *E. coli* which encodes multiple copies of many tRNA isoacceptors. Fig. 2 shows nearly no tRNA with 5'-A in the anticodon and only half of the *Aquificales* have some anticodons with 5'-C, where the non-*Aquificaceae* apparently favored the reduction of such tRNA genes (Fig. 3). Important tRNA modification enzymes (TadA – tRNA adenosine deaminase and TilS – tRNA-Ile lysidine synthetase) are encoded in *Aquificales* and X-ray structures of TadA and TilS from *A. aeolicus* have been reported [77, 78]. TadA converts A residues in the 5'-position of certain tRNA anticodons to inosine to expand wobble decoding, and TilS converts the 5'-C residue in the CAU anticodon of specific tRNA-Ile molecules to lysidine (2-lysyl cytidine; abbreviated as *L* or *k²C*) to decode 5'-AUA (Ile) codons instead of 5'-AUG (Met) codons [79]. Without this posttranscriptional modification, decoding of isoleucine AUA codons would be impossible [80, 81, 82]. Selenocysteine-specific tRNAs decoding 5'-UGA are present in the *Aquificaceae* (except for *Hydrogenobaculum sp.*) and in the *Desulfurobacteriaceae* (*T. ammonificans* and *D. thermolithotrophum*), but are absent from the *Hydrogenothermaceae* (*P. marina*, *S. azorensis*, *Sulfurihydrogenibium sp.*; see Fig. 2). The *Aquificaceae* (except *Hydrogenivirga sp.*), in contrast to the other *Aquificales* or mesophiles such as *E. coli* or *B. subtilis*, encode the lysine isoacceptor with the anticodon 5'-CUU to decode the AAG codon.

RNase P The catalytic RNA subunit of the tRNA processing endoribonuclease RNase P was previously identified in *P. marina* and *S. azorensis* [83]. Additionally, RNase P

Table 3 Codon usage of AAE based on 1,255 protein-coding genes comprising 431,072 codons. Codon usage of other Aquificales can be viewed in the Supplemental Material. aa – amino acid; the fraction of a particular amino acid encoded by the respective codon is given (1 for Trp encoded by a single codon).

	Codon	aa	%	Fraction	Codon	aa	%	Fraction	Codon	aa	%	Fraction	Codon	aa	%	Fraction	
U	UUU	Phe (F)	2.9	0.56	UCU	Ser (S)	0.9	0.18	UAU	Tyr (Y)	0.8	0.18	UGU	Cys (C)	0.4	0.49	U
	UUC	Phe (F)	2.3	0.44	UCC	Ser (S)	1.3	0.27	UAC	Tyr (Y)	3.4	0.82	UGC	Cys (C)	0.4	0.51	C
	UUA	Leu (L)	1.7	0.16	UCA	Ser (S)	0.7	0.15	UAA	stop	0.1	0.49	UGA	stop	0.1	0.37	A
	UUG	Leu (L)	0.8	0.08	UCG	Ser (S)	0.4	0.07	UAG	stop	0	0.14	UGG	Trp (W)	0.9	1	G
C	CUU	Leu (L)	2.7	0.25	CCU	Pro (P)	1.1	0.26	CAU	His (H)	0.3	0.16	CGU	Arg (R)	0.2	0.03	U
	CUC	Leu (L)	3.1	0.3	CCC	Pro (P)	1.8	0.42	CAC	His (H)	1.3	0.84	CGC	Arg (R)	0.1	0.03	C
	CUA	Leu (L)	0.8	0.07	CCA	Pro (P)	0.6	0.14	CAA	Gln (Q)	0.7	0.35	CGA	Arg (R)	0.1	0.01	A
	CUG	Leu (L)	1.4	0.14	CCG	Pro (P)	0.7	0.18	CAG	Gln (Q)	1.3	0.65	CGG	Arg (R)	0.1	0.02	G
A	AUU	Ile (I)	1.7	0.23	ACU	Thr (T)	1	0.23	AAU	Asn (N)	1.1	0.3	AGU	Ser (S)	0.8	0.16	U
	AUC	Ile (I)	1	0.13	ACC	Thr (T)	1.2	0.27	AAC	Asn (N)	2.5	0.7	AGC	Ser (S)	0.8	0.17	C
	AUA	Ile (I)	4.6	0.63	ACA	Thr (T)	0.9	0.21	AAA	Lys (K)	4.4	0.48	AGA	Arg (R)	1.9	0.38	A
	AUG	Met (M)	1.8	1	ACG	Thr (T)	1.2	0.29	AAG	Lys (K)	4.8	0.52	AGG	Arg (R)	2.6	0.53	G
G	GUU	Val (V)	3	0.38	GCU	Ala (A)	1.6	0.26	GAU	Asp (D)	1.6	0.37	GGU	Gly (G)	1.6	0.23	U
	GUC	Val (V)	0.9	0.11	GCC	Ala (A)	1.3	0.21	GAC	Asp (D)	2.7	0.63	GGC	Gly (G)	0.9	0.12	C
	GUA	Val (V)	2.5	0.32	GCA	Ala (A)	1.7	0.29	GAA	Glu (E)	6.2	0.65	GGA	Gly (G)	3.4	0.5	A
	GUG	Val (V)	1.5	0.19	GCG	Ala (A)	1.4	0.24	GAG	Glu (E)	3.3	0.35	GGG	Gly (G)	1	0.15	G



RNAs were easily identified here with Bcheck in *Sulfurihydrogenibium* sp., *T. ammonificans* and *D. thermolithotrophum*. In the *Aquificaceae*, RNase P RNA candidates were neither detected with Bcheck, rnabob nor by manual *in silico* search methods using cDNA libraries of *A. aeolicus*. This is consistent with the negative results of previous searches for RNase P RNA in *A. aeolicus* [84, 85].

All identified RNase P RNAs lack the P18 element, which appears to be a general feature of type A RNase P RNAs in the *Hydrogenothermaceae* and *Desulfurobacteriaceae*. The *Sulfurihydrogenibium* sp., *T. ammonificans* and *D. thermolithotrophum* RNAs differ from their *P. marina* and *S. azorensis* counterparts by a weaker L9-P1 tertiary contact (L9 5'-GYAA tetraloop docking on an A-U/G-C tandem bp instead of a G-C/G-C tandem which is a hallmark of RNase P RNAs from thermophiles [83, 86]). Other differences are: (1) very short P12 stems in *T. ammonificans* and *D. thermolithotrophum*, (2) particularly weak P17 stems in *Sulfurihydrogenibium* sp. and *D. thermolithotrophum*, (3) a destabilized L8-P4 interaction, a destabilized P14 helix, but a stabilized L14-P8 interaction in *T. ammonificans*. For details, see RNase P RNA 2D structures in the Supplemental Material.

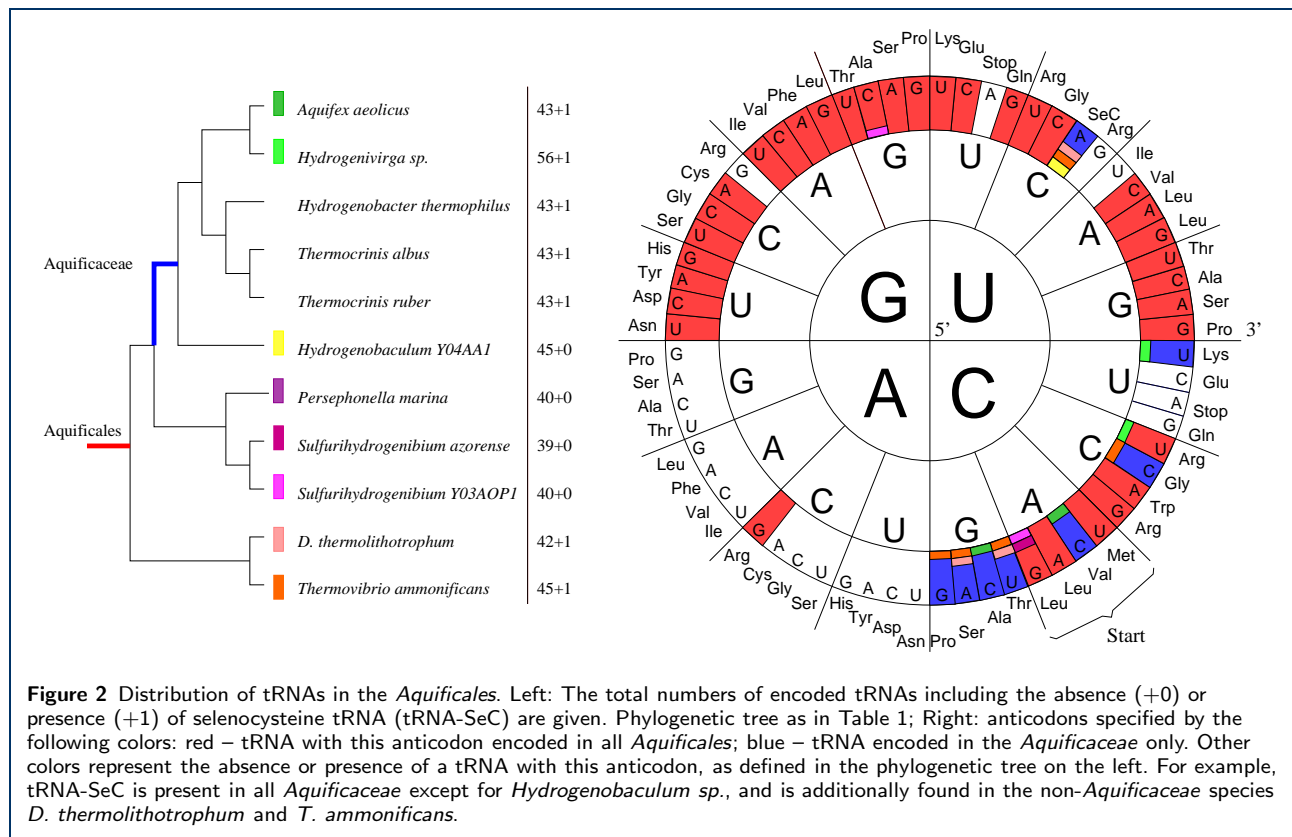
6S RNA Bacterial 6S RNAs, about 200 nt in length, form a rod-shaped secondary structure with a central bulge region flanked by largely helical arms on both sides. Their structure is thought to mimic the structure of an open

DNA promoter [87, 88]. 6S RNAs bind to the housekeeping RNA polymerase holoenzyme to block transcription at DNA promoters, primarily upon entry of cells into stationary growth phase. When nutrients are resupplied (including NTPs), RNA polymerase massively synthesizes transcripts (so-called product RNAs – pRNAs) on 6S RNA as template, which lead to a structural rearrangement of 6S RNA and release of RNA polymerase. Thus, 6S RNA is a fast riboregulator that makes RNA polymerase instantly available for a new exponential growth when nutrients are resupplied [65, 89, 90, 91, 92].

In *A. aeolicus* the 6S RNA was clearly identified via an experimental RNomics approach [84]. 6S RNA candidates in the other *Aquificales* were predicted computationally using the Rfam covariance model and, as expected, vary substantially in primary, but less in secondary structure. For *Hydrogenivirgia* we found two copies. Predicted 6S RNAs for *T. ammonificans* and *D. thermolithotrophum* remain candidates since they differ substantially from those of other *Aquificales*. The RNAalifold consensus structure for the 6S RNA candidates from all other *Aquificales* analyzed here is shown in the Supplement. Individual RNAfold predictions (see Supplemental Material for details) support the notion that they are *bona fide* 6S RNAs.

In the case of *A. aeolicus* 6S RNA, we proposed that formation of a “central bulge collapse” helix (Fig. 4-Top, [84]) is the major component of the pRNA-induced rearrangement of this 6S RNA structure [89]. If at all, or to which extent, the adjacent hairpin structure forms in the pRNA-rearranged structure remains to be investigated. For the eight other 6S RNA candidates (Fig. 4), we predicted rod-shaped structures with a destabilized central region that is not necessarily purely single-stranded (see Supplemental Material for further details). According to our proposals, pRNAs would start with a G residue in the *Aquificaceae*, whereas those of the *Hydrogenothermaceae* (*P. marina*, *S. azorensis* and *Sulfurihydrogenibium* sp.) would initiate with an A residue.

tmRNA In bacteria, stalling of translating ribosomes on truncated mRNAs is rescued through action of the dual-function transfer-messenger RNAs (tmRNAs) [93, 94]. The



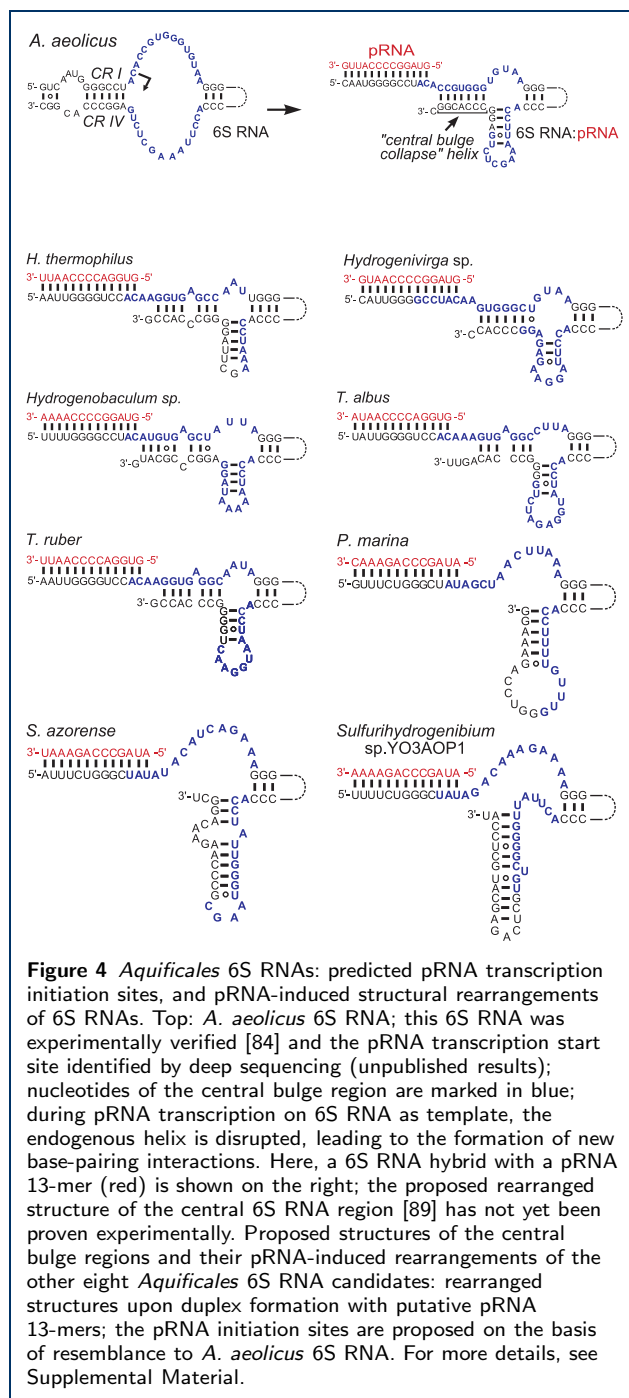
tRNA-like domain is present and highly conserved in all *Aquificales*. An architectural feature of tmRNAs is their intricate structure consisting of four pseudoknots. Interestingly, we found two different types of tmRNAs, introduced here as type A (present in the *Aquificaceae*) and B (specific to *Hydrogenothermaceae* and *Desulfurobacteriaceae*). This classification is based on the observation that the lower stem of pseudoknot 1 (pk1) involves 4-5 bp in type A tmRNAs, but only 2-3 bp in type B variants (Fig. 5, Supplemental Material). Pk1 is critical for tmRNA function and binds near the ribosomal decoding site [94]. Mutational analysis of *E. coli* tmRNA revealed that mutations disrupting the upper stem of pk1 are not tolerated, whereas the outer two base pairs of the lower stem (Fig. 5) can be disrupted (resulting in a 3-bp stem) without loss of function [94]. On the other hand, the tmRNA of another thermophile, *Thermotoga maritima*, is expanded to 7 bp [95]. This raises the question if the *Aquificales* type B tmRNAs, for which only a 2-bp stem 4 is predicted (*Sulfurihydrogenibium* sp., *P. marina* and *S. azurensis*), are still able to form this pseudoknot, or if the weakness or absence of this stem is compensated for by e.g. tmRNA ligand interactions that are idiosyncratic to the *Aquificales* encoding a type B tmRNA.

The messenger RNA-like regions (MLR), which are in close vicinity of pk1, encode tag preptides of 10 amino

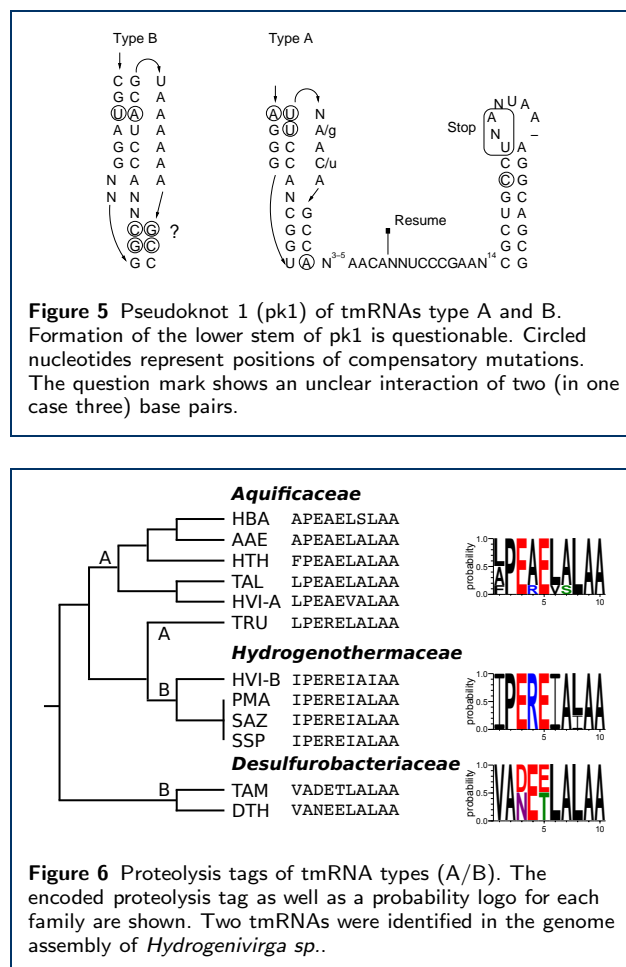
acids, with subphyla-specific signatures (Fig. 6). For example, all *Aquificaceae* and *Hydrogenothermaceae* tmRNAs code for a proline at the second position, which is alanine in the *Desulfurobacteriaceae*. The genome of *Hydrogenivirga* sp. appears to encode both types of tmRNAs (type A and B). Whether this reflects a genuine tmRNA gene duplication rather than a genome contamination or assembly artefact remains to be clarified (see below).

Furthermore, *Hydrogenobaculum* sp. carries a 78-nt hairpin-like insertion in the pseudoknot 4 (pk4) region, which however is compatible with formation of pk4 (Fig. 7). Such a long extension within tmRNAs has been not reported yet.

CRISPR system For each member of the *Aquificales* we could identify at least one locus of clustered interspaced short palindromic repeat sequences (CRISPRs), which are involved in an immunity against viruses and plasmids [96]. Although the *Aquificales* have very compact genomes, the number of identified CRISPR clusters varied from one to thirteen (Table 1), indicating the presence of thermostable viruses in extreme environments as reported for Archaea [97]. The number of CRISPR clusters does not seem to be clade-specific. Also, the number of repeats in a cluster varies strongly. For example, in *T. albus* we found in total four CRISPR systems containing 36, 41, 57 and 63



repeats, whereas in *A. aeolicus* the five CRISPR loci only had four to five repeats. For some, but not all of the CRISPR clusters, we could detect associated *cas* genes. The exact numbers of detected CRISPR clusters and Cas protein cassettes can be seen in Table 1. In this table we included only CRISPR clusters that were found by both approaches (crt and crisprfinder). It has to be kept in mind that the genome of *Hydrogenivirga* sp. is in an unfinished state, so

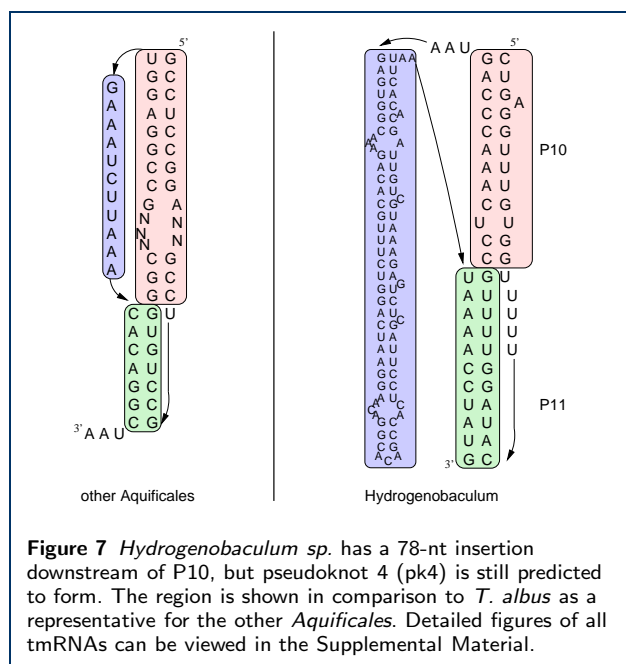
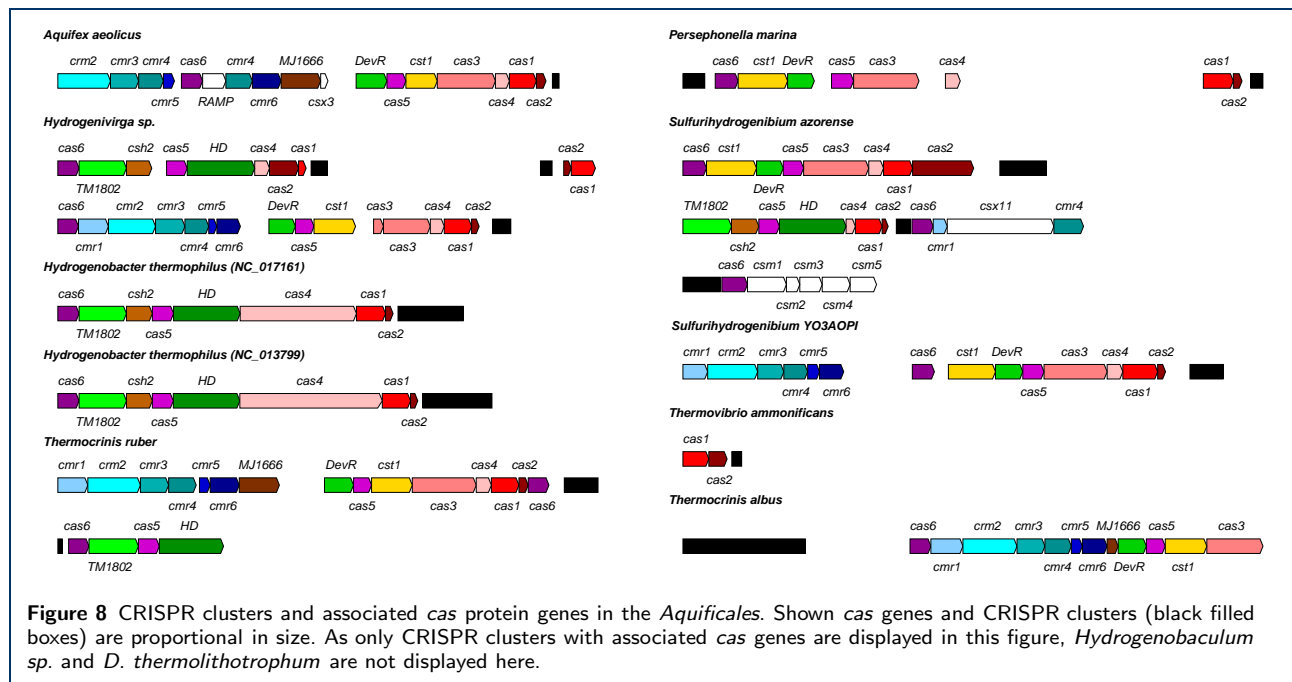


it is possible that some CRISPR loci and especially associated *cas* genes escaped detection.

Other ncRNA SRP RNA was found once per genome being highly conserved in sequence and structure (See Supplemental Material). Additionally, we show some riboswitch candidates: TPP, MOCO, Cobalamin and *crcB* (see Table 1). The MOCO riboswitch found in *T. ammonificans* and the two *crcB* riboswitches identified in *Hydrogenobaculum* sp. conform well to the Rfam conservation model (see Supplemental Material). Riboswitches were only found sporadically among the *Aquificales*.

3.4 Novel ncRNAs in *A. aeolicus*

Besides the annotation of ncRNAs with known functions, we additionally aimed to detect novel ncRNAs, as they often regulate transcription or play an important role as post-transcriptional regulators. Here we combined *in silico* analysis of the *A. aeolicus* genome and dRNA-seq data from the same organism to identify novel ncRNA candidates, some of which were subsequently analyzed by Northern blot analysis.



In the *in silico* search, small ncRNAs (sRNAs) were distinguished from proteins by the following analysis steps which we performed for *A. aeolicus*: (1) The GC-content of the whole genome is 43%. However, the ncRNAs described above show an average GC-content of 66%. We associated each nucleotide with a local GC-value. (2) The function of small ncRNAs, e.g. 6S RNA, is often determined by their stable secondary structure. To each position

in the genome, we assigned the minimum free energy of the most stable local secondary structure including this nucleotide, using RNALfold. (3) Most ncRNAs are conserved among closely related organisms. We calculated genome-wide multiple sequence alignments (MSA) with TBA and Pomago of all *Aquificales* genomes, which can be viewed in the Supplemental Material. (4) Based on the MSAs we performed a novel ncRNA prediction with RNAz and displayed their probability.

All ncRNA candidates with a minimum length of 25 nt and not overlapping protein-coding sequences, rRNA operons or tRNAs, were summarized in a full candidate table, containing all properties mentioned above (see Supplemental Material). A subset of these genes can be seen in Table 4. We identified 99 putative loci for ncRNAs, abbreviated n1 to n99. All above annotated ncRNAs, such as tmRNA (n74) or SRP RNA (n85) were mutually confirmed by our dRNA-seq and *in silico* approaches. Interestingly, known ncRNAs as well as novel ncRNA candidates show a significant level of antisense transcripts (see examples in Fig. 9 and 10). For unknown ncRNAs the sense direction is not assignable. Putative ncRNAs, referring to one genomic location and having comparable numbers of cDNA read counts on both strands, are described with the same ID.

For comparison reasons, we also added tRNAs to our table of ncRNAs, which show the feature of sense-antisense (s/as) expression. To exclude the possibility of mapping or other artefacts, we confirmed the presence of antisense transcripts exemplarily by Northern blots for tmRNA and tRNA 44 (Pro-TGG) (Fig. 9).

Furthermore, Northern blots were conducted for the loci encoding candidates n25 and n75, for which the dRNA-seq

Table 4 Selection of highly potential novel ncRNA candidates of *A. aeolicus*. The genomic locations and GC-content are listed in column 2-4. cDNA – the maximal number of observed read counts in the (+)- and (-)-library; Annotation – overlap to predicted proteins by BacProt; RNALfold – energy in kcal/mol of locally stable RNA secondary structure predicted by RNALfold; Cons.p and Cons.t – number of species with homologous regions aligned by Pomago and TBA; RNAz – probabilities > 0.5 (based on multiple sequence alignments calculated by POMAGO (p) or TBA (t)). Further observations, for example that *Aae-65* was described earlier in [84], are noted in the last column. A complete list of novel ncRNA candidates, and tRNAs can be found in the Supplemental Material.

ID	5' boundary	Location 3' boundary	Strand	GC	cDNA (+/-)	Annotation (NCBI/BacProt)	RNALfold	Structure and Sequence				Remarks
Known ncRNAs												
45	567675	567915	-	0.53	2237/899	murF/UDP	-3.89	11	7	no	0.9990	downstream of 5s RNA
74	1153499	1153856	-	0.65	83/31	tmRNA/no	-5.04	6	11	no	0.9996	tmRNA
78	1219679	1219903	+	0.55	382/1384	pheT/phenylalanyl-tRNA	-6.59	11	11	no	no	6S RNA
85	1303758	1303875	+	0.57	5239/456	no/no	-4.15	11	11	no	0.7085	SRP RNA
Putative Novel ncRNAs												
2	15301	15474	+	-	0/0	no/no	-3.66	no	5	no	no	plasmid region
6	69101	69198	-	0.37	809/545	no/no	-4.71	11	11	no	no	Aae-65 [84]
25	328934	328995	+	0.37	582/250	no/no	no	9	9	no	no	
48	620054	620211	-	0.44	41/71	no/no	-3.13	11	9	no	no	
58	739705	739811	+	0.44	41/144	no/no	-3.92	11	11	no	no	
68	989704	989840	+	0.50	476/756	aq_1392/auxin	-4.53	4	2	no	no	
74	1153547	1153769	+	0.65	326/51	no/no	-5.04	6	11	no	0.9996	
75	1168974	1169071	-	0.55	158/79	aq_1666/no	-3.84	3	3	no	no	
80	1231909	1232006	+	0.38	860/2339	no/no	-3.74	11	2	no	no	
97	1491199	1491559	-	0.40	10/297	rfaG/glycosyl	-4.60	11	11	no	no	
Tail to tail Transcripts (T2T)												
t2t10	608075	608182	+	0.52	60/20	aq_880/no	-3.70	11	11	no	no	
	608075	608308	-	0.48	22/12	aq_881/1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate	-3.70	11	11	no	no	
t2t17	1336433	1336708	+	0.46	380/87	aq_1896/pred	no	11	11	no	no	
	1336544	1336642	-	0.51	100/55	folD/methenyltetrahydrofolate	no	11	11	no	no	
t2t20	1479248	1479345	+	0.44	180/117	prmA/ribosomal	no	11	8	no	no	
	1479168	1479508	-	0.43	12/62	acs%27/pred	-3.19	11	8	no	no	
tRNAs with sense transcripts only												
t06;43	383154	383390	-	0.52	9/2	recN;tRNA/pred	-3.53	11	10	no	0.9943	
tRNAs with sense and various antisense transcripts												
t34;15	1356464	1356743	+	0.64	23/5	tRNA/no	-5.43	11	10	0.9996	0.9992	
	1356461	1356575	-	0.60	61/15	no/no	-5.43	11	9	0.9996	0.9992	
t44;20	1531016	1531131	+	0.58	1141/437	ihfB/no	-4.33	7	9	no	0.9951	
	1531004	1531130	-	0.56	335/136	tRNA/no	-4.33	7	9	no	0.9951	

data indicated sense and antisense transcription each differing between the (+)- and (-)-library (Fig. 10). For n25, we found most transcripts on the plus strand in the (+)-library (582), whereas less than half as many transcripts (250) were detected in the (-)-library. Interestingly, an inverse relation was observed for the minus strand (50/361). For n25, Northern blot detection revealed a signal somewhat shorter than the one expected on the cDNA read boundaries, whereas no signal could be detected for antisense transcripts (Fig. 10, top). This finding suggests that the sense transcript is the major one. In the case of n75, both sense and antisense transcripts of comparable intensity were detected, the major signals of the Northern blot representing RNAs larger and smaller than anticipated from the read boundaries (Fig. 10, bottom). Thus, the polarity of the putative ncRNA gene remains unclear.

Interestingly, very high transcription levels are found in overlapping 5'-upstream regions of two protein-coding genes located on opposing strands (Table 4). Beside these so-called head-to-head (h2h) transcripts we furthermore observed tail-to-tail overlaps (t2t, two 3'-untranslated regions overlapping on opposing strands) that are represented by very high read coverage (Supplemental Material). If these are real transcripts with a certain function or artefacts remains unclear.

4 Conclusion

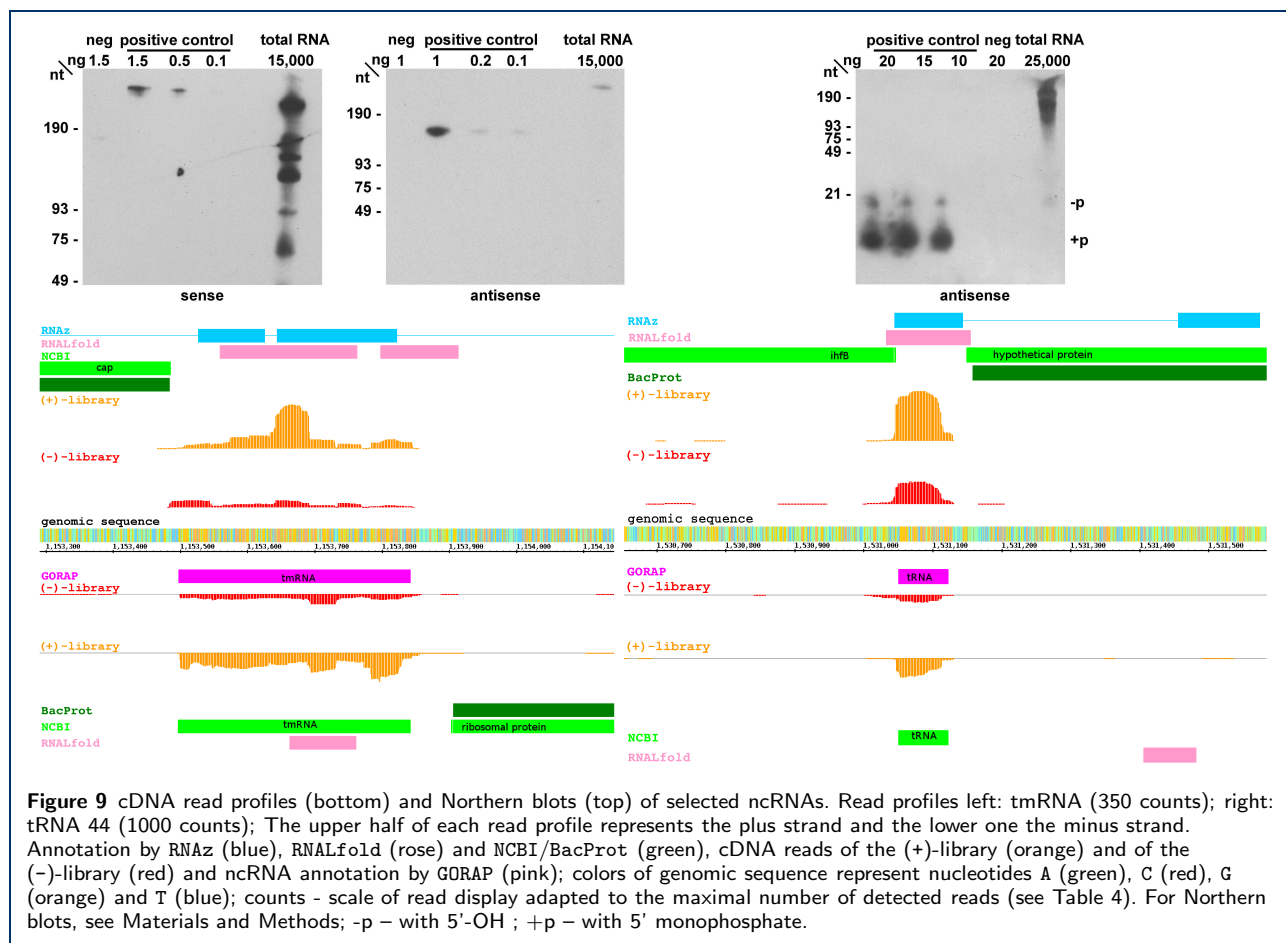
With the advent of a growing number of *Aquificales* genome sequences in public databases, we have re-analyzed this group of bacteria thriving in extreme environments.

The *Aquificales* share the feature of a small, compact genome with a reduced number of protein and ncRNA genes. The genes for tRNAs are reduced to a minimum but retain the capacity to decode all types of codons, and rRNA genes are confined to 2-3 copies each. Several classical ncRNAs are present, such as SRP RNA, tmRNA, 6S RNA, RNase P RNA (except for all *Aquificaceae*) and riboswitch candidates in some *Aquificales*. Furthermore, by combining *in silico* analysis with dRNA-seq data of *A. aeolicus*, we were able to predict nearly 100 novel ncRNA candidates, some of which might be specific to the *Aquificales*. Finally, CRISPR systems of bacterial immunity were identified.

Re-annotation of protein genes using BacProt revealed novel proteins with unknown function, some of which might turn out to be specific to the *Aquificales* as well. On average, 63 additional proteins were found that were missing in the respective original annotation.

In our cDNA libraries of *A. aeolicus*, we observed massive amounts of antisense reads with similar patterns (length and amount) at putative ncRNA loci and terminal regions of mRNAs. Examples of transcripts antisense to tmRNA and tRNA are illustrated in Fig. 9.

We compared 40 bacterial and 2 archaeal genomes (see Supplemental Material), and the presence or absence of proteins was used to determine their position in the phylogenetic tree of bacteria. Both Archaea form a clear out-group. *Thermodesulfator indicus* branches first in the group of Bacteria, followed immediately by the *Aquificales*, while other bacterial branches diverge later. In an



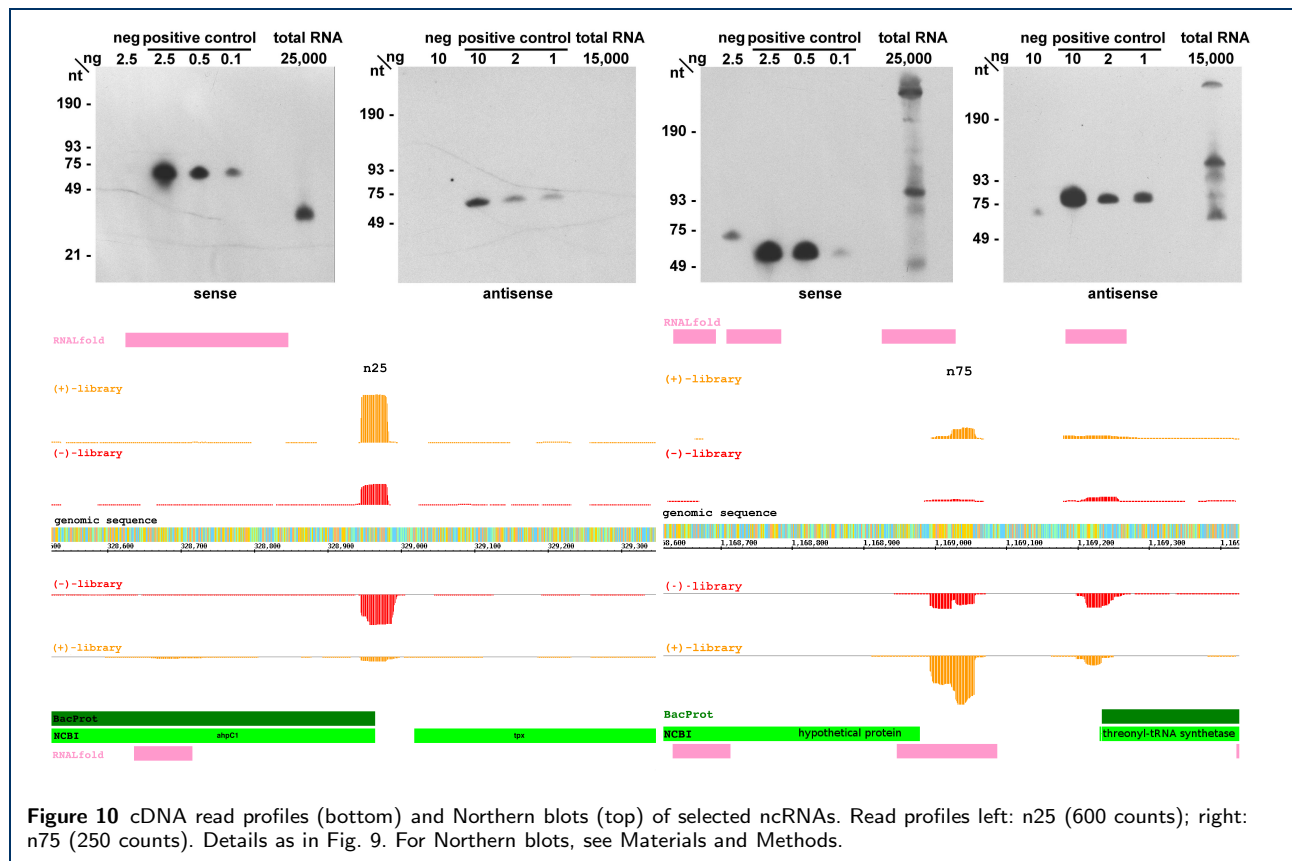
additional protein-based analysis, we took the sequences of single-copy orthologs that were present in at least 50% of all species (concatenated 57,260 aa) (see Supplemental Material). In contrast to the protein presence/absence tree, neither the *Aquificales* nor *T. indicus* were placed at a basal position here. However, the two groups are still in close vicinity to each other. This analysis not necessarily excludes the possibility of the *Aquificales* being a basal clade. The selection of orthologs being present in at least 50% of the species leads to a lower coverage of orthologs present in Archaea species and therefore may favor long branch attraction [98]. The idea behind selecting frequently occurring single-copy orthologs was to produce phylogenetic trees being less influenced by horizontal gene transfer. However, proteins shared by Archaea and *Aquificales* only are not part of the selected “50% group” of proteins and are therefore not considered in this analysis.

Both protein-based phylogenetic trees disagree with a previous study [3] where *Desulfobacterium autotrophicum HRM2*, a δ -proteobacterium, was added to the *Desulfurobacteriaceae* family based on 16S rRNA analysis. We assume that this was an artefact of the high GC-content of rRNAs due to the high environmental temperatures. Re-

garding their proteomes, *Aquificales* and *D. autotrophicum* are not significantly related.

The results of the 16S rRNA phylogenetic analysis did not show a clear picture. Depending on the method used for reconstruction, the *Aquificales* were either placed near the root of the bacterial tree (MrBayes and RAxML with GTRGAMMA substitution model) or not (NJ and RAxML with GTRCAT) (see Supplemental Material). In accordance with the results of [26], the *Aquificales* were always placed close to the *Thermotogales* and *Thermales-Deinococcales*, Archaea were more closely related to the *Aquificales* than to the *Thermotogales*.

We identified two 6S RNA and two tmRNA candidate genes in *Hydrogenivirga sp.*, rather than a single one as in the other *Aquificales*. Likewise, *Hydrogenivirga sp.* has a comparatively high amount of tRNA copies and CRISPR loci and its genome is estimated to be of roughly double the size of the other *Aquificales* genomes. Combined, these observations support the notion that the *Hydrogenivirga sp.* genome assembly is erroneous or two genomes of related bacteria (one type from *Hydrogenothermaceae*) have entered the sequencing project, being in agreement with [73]. Based on the tmRNA tag peptides



identified in the *Hydrogenivirga sp.* assembly, the second one (*Hydrogenivirga sp.-B*: IPEREIAIAA) matches the sequence exclusively found among the *Hydrogenothermaceae*, although *Hydrogenivirga sp.* belongs to the *Aquificaceae* (see Fig. 6). This suggests that the *Hydrogenivirga sp.* assembly is a blend of sequences from a member of the *Aquificaceae* and a member of the *Hydrogenothermaceae*.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Markus Fricke for tmRNA structure visualization, Brice Felden for tmRNA discussion, J. Sugahara for the SPLITS run in *A. aeolicus*, Jörg Vogel and Cynthia Sharma from the University of Würzburg for help with differential RNA-Sequencing. MM was funded by the Carl-Zeiss-Stiftung. This work was supported in part by DFG-Graduiertenkolleg 1384 "Enzymes and multienzyme complexes acting on nucleic acids" (ML), and DFG project MA-5082/1 (SW).

Author's contribution

Bioinformatical analysis: ML, SW, KR, BMB, NW, and MM. Experimental validation: AIN and RKH. Analyzed data: all. Wrote, read and approved the final manuscript: all.

Supplemental Material

Supplemental data, in particular machine-readable sequence alignments, fasta-, stk-, and gff-files, phylogenetic trees, Shine-Dalgarno and Pribnow box motifs can be found at <http://www.rna.uni-jena.de/supplements/aquificales/>.

Author details

¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6, 35032, Marburg, Germany.

²Friedrich-Schiller-University Jena, Faculty of Mathematics and Computer Science, Leutragraben 1, 07743, Jena, Germany. ³University of Leipzig, Faculty of Mathematics and Informatics, Augustusplatz 10, 04109, Leipzig, Germany. ⁴EMBL, Meyerhofstrasse 1, 69117, Heidelberg, Germany.

References

1. Setchell, W.A.: The upper temperature limits of life. *Science* **17**(441), 934–937 (1903)
2. Reysenbach, A.L., Wickham, G.S., Pace, N.R.: Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in octopus spring, Yellowstone national park. *Appl Environ Microbiol* **60**(6), 2113–2119 (1994)
3. Hügler, M., Huber, H., Molyneux, S.J., Vetriani, C., Sievert, S.M.: Autotrophic CO₂ fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle in different lineages within the phylum Aquificae: evidence for two ways of citrate cleavage. *Environ Microbiol* **9**(1), 81–92 (2007)
4. Reysenbach, A.-L.: Class I: Aquificae class. nov. G. M. Garrity, D. R. Boone, and R. W. Castenholz (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag, New York, 359–367 (2001)
5. Bonch-Osmolovskaya, E.: Aquificales. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. (2008)
6. Aravind, L., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Walker, D.R., Koonin, E.V.: Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet* **14**(11), 442–444 (1998)
7. Eder, W., Huber, R.: New isolates and physiological properties of the Aquificales and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles* **6**(4), 309–318 (2002)
8. Santos, H., Lamosa, P., Borges, N., Goncalves, L., Pais, T., Rodrigues, M.: *Extremophiles Handbook: Organic Compatible Solutes of Prokaryotes that Thrive in Hot Environments: The Importance of Ionic Compounds for Thermostabilization*. Springer, ??? (2011)

9. Scholz, S., Sonnenbichler, J., Schäfer, W., Hensel, R.: Di-myo-inositol-1,1'-phosphate: a new inositol phosphate isolated from *Pyrococcus woesei*. *FEBS Lett* **306**(2-3), 239–242 (1992)
10. Jorge, C.D., Lamosa, P., Santos, H.: Alpha-D-mannopyranosyl-(1-2)-alpha-D-glucopyranosyl-(1-2)-glycerate in the thermophilic bacterium *Petrotoga mitherma*—structure, cellular content and function. *FEBS J* **274**(12), 3120–3127 (2007)
11. Brosnan, C.A., Voinnet, O.: The long and the short of noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol* **21**(3), 416–425 (2009)
12. Collins, L.J.: The RNA infrastructure: an introduction to ncRNA networks. *Adv Exp Med Biol* **722**, 1–19 (2011)
13. de la Fuente, M., Valera, S., Martínez-Guitarte, J.L.: ncRNAs and thermoregulation: a view in prokaryotes and eukaryotes. *FEBS Lett* **586**(23), 4061–4069 (2012)
14. Marz, M., Stadler, P.F.: RNA interactions. *Adv Exp Med Biol* **722**, 20–38 (2011)
15. Erdmann, V.A., Barciszewska, M.Z., Hochberg, A., de Groot, N., Barciszewski, J.: Regulatory RNAs. *Cell Mol Life Sci* **58**(7), 960–977 (2001)
16. Barrangou, R.: CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev RNA* (2013)
17. Macvanin, M., Edgar, R., Cui, F., Trostel, A., Zhurkin, V., Adhya, S.: Noncoding RNAs binding to the nucleoid protein HU in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **194**(22), 6046–6055 (2012)
18. Chevalier, C., Boisset, S., Romilly, C., Masquida, B., Fechter, P., Geissmann, T., Vandenesch, F., Romby, P.: *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS Pathog* **6**(3) (2010)
19. Rice, J.B., Balasubramanian, D., Vanderpool, C.K.: Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(40), 2691–2698 (2012)
20. Pitulle, C., Yang, Y., Marchiani, M., Moore, E.R., Siefert, J.L., Aragno, M., Jurtshuk, P., Fox, G.E.: Phylogenetic position of the genus *Hydrogenobacter*. *Int J Syst Bacteriol* **44**(4), 620–626 (1994)
21. Brown, J.R., Doolittle, W.F.: Root of the universal tree of life based on ancient aminoacyl-tRNA synthetase gene duplications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2441–2445 (1995)
22. Bocchetta, M., Gribaldo, S., Sanangelantoni, A., Cammarano, P.: Phylogenetic depth of the bacterial genera aquifex and thermotoga inferred from analysis of ribosomal protein, elongation factor, and RNA polymerase subunit sequences. *J Mol Evol* **50**(4), 366–380 (2000)
23. Olsen, G.J., Woese, C.R., Overbeek, R.: The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**(1), 1–6 (1994)
24. Baldauf, S.L., Palmer, J.D., Doolittle, W.F.: The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15), 7749–7754 (1996)
25. Wetmur, J.G., Wong, D.M., Ortiz, B., Tong, J., Reichert, F., Gelfand, D.H.: Cloning, sequencing, and expression of reca proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. *J Biol Chem* **269**(41), 25928–25935 (1994)
26. Oshima, K., Chiba, Y., Igarashi, Y., Arai, H., Ishii, M.: Phylogenetic position of Aquificales based on the whole genome sequences of six Aquificales species. *Int J Evol Biol* **2012**, 859264–859264 (2012)
27. Wieseke, N., Lechner, M., Ludwig, M., Marz, M.: POMAGO: Multiple Genome-Wide Alignment Tool for Bacteria. In: Cai, Z., Eulenstein, O., Janies, D., Schwartz, D. (eds.) *Bioinformatics Research and Applications. Lecture Notes in Computer Science*, vol. 7875, pp. 249–260. Springer, ??? (2013)
28. Blanchette, M., Kent, W.J., Riemer, C., Elnitski, L., Smit, A.F., Roskin, K.M., Baertsch, R., Rosenbloom, K., Clawson, H., Green, E.D., Haussler, D., Miller, W.: Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner. *Genome Res* **14**(4), 708–715 (2004)
29. Rose, D., Hertel, J., Reiche, K., Stadler, P.F., Hackermüller, J.: *ncDNAalign*: plausible multiple alignments of non-protein-coding genomic sequences. *Genomics* **92**(1), 65–74 (2008)
30. Lechner, M.: Detection of orthologs in large-scale analysis. Master's thesis, University of Leipzig (December 2009)
31. Lechner, M., Findel, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P.F., Prohaska, S.J.: Proteinortho: detection of (co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics* **12**, 124–124 (2011)
32. Polard, P., Prère, M.F., Chandler, M., Fayet, O.: Programmed translational frameshifting and initiation at an AUU codon in gene expression of bacterial insertion sequence IS911. *J Mol Biol* **222**(3), 465–77 (1991)
33. Spiers, A.J., Bergquist, P.L.: Expression and regulation of the RepA protein of the RepFIB replicon from plasmid P307. *J Bacteriol* **174**(23), 7533–41 (1992)
34. Binns, N., Masters, M.: Expression of the *Escherichia coli* pcnB gene is translationally limited using an inefficient start codon: a second chromosomal example of translation initiated at AUU. *Mol Microbiol* **44**(5), 1287–98 (2002)
35. Lowe, T.M., Eddy, S.R.: tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucl. Acids Res.* **25**, 955–964 (1997)
36. Sugahara, J., Yachie, N., Sekine, Y., Soma, A., Matsui, M., Tomita, M., Kanai, A.: SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. *In Silico Biol* **6**(5), 411–418 (2006)
37. Laslett, D., Canback, B.: ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* **32**(1), 11–16 (2004)
38. Dilimulati, Y., Marz, M., Stadler, P.F., Hofacker, I.L.: Bcheck: a wrapper tool for detecting RNase P RNA genes. *BMC Genomics* (2010)
39. Bland, C., Ramsey, T.L., Sabree, F., Lowe, M., Brown, K., Kyrpides, N.C., Hugenoltz, P.: CRISPR recognition tool (crt): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats. *BMC Bioinformatics* **8**, 209–209 (2007)
40. Grissa, I., Vergnaud, G., Pourcel, C.: CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue), 52–57 (2007)
41. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3), 403–10 (1990)
42. UniProt Consortium: Reorganizing the protein space at the universal protein resource (uniprot). *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue), 71–75 (2012)
43. Nawrocki, E.P., Kolbe, D.L., Eddy, S.R.: Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics* **25**, 1335–1337 (2009)
44. Gardner, P.P., Daub, J., Tate, J.G., Nawrocki, E.P., Kolbe, D.L., Lindgreen, S., Wilkinson, A.C., Finn, R.D., Griffiths-Jones, S., Eddy, S.R., Bateman, A.: Rfam: updates to the RNA families database. *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue), 136–140 (2009)
45. Wuyts, J., Perrière, G., Van De Peer, Y.: The european ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue), 101–103 (2004)
46. Eddy, S.R.: RNABOB: a program to search for RNA secondary structure motifs in sequence databases (1992-1996). <http://selab.janelia.org/software.html>
47. Hofacker, I.L., Fekete, M., Stadler, P.F.: Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. *J. Mol. Biol.* **319**, 1059–1066 (2002)
48. Hofacker, I.L.: Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3429–3431 (2003)
49. Hofacker, I.L., Fontana, W., F, S.P., L, B.S., Tacker, M., Schuster, P.: Fast folding and comparison of RNA secondary structures. *Monatsh. Chem.* **125**, 167–188 (1994)
50. Bernhart, S.H., Hofacker, I.L., Will, S., Gruber, A.R., Stadler, P.F.: RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics* **9**, 474–474 (2008)
51. Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.: CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680 (1994)
52. Otto, W., Will, S., Backofen, R.: Structure local multiple alignment of RNA. In: *Proceedings of German Conference on Bioinformatics (GCB'2008). Lecture Notes in Informatics (LNI)*, vol. P-136, pp. 178–188. Gesellschaft für Informatik (GI), ??? (2008)
53. Griffiths-Jones, S.: RALEE—RNA Alignment editor in Emacs. *Bioinformatics* **21**, 257–259 (2005)
54. Federhen, S.: The NCBI taxonomy database. *Nucleic acids research* **40**(Database issue), 136–143 (2012)
55. Rokas, A.: Phylogenetic analysis of protein sequence data using the

- randomized accelerated maximum likelihood (RAXML) program. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 19** (2011)
56. Subramanian, A.R., Kaufmann, M., Morgenstern, B.: DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. *Algorithms Mol Biol* **3**, 6–6 (2008)
 57. Le, S.Q., Gascuel, O.: Phylogenetic mixture models for proteins. *Mol Biol Evol* **25**(7), 1307–1320 (2008)
 58. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T.: MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Res* **30**(14), 3059–3066 (2002)
 59. Kimura, M.: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**(2), 111–120 (1980)
 60. Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P.: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**(12), 1572–1574 (2003)
 61. Stamatakis, A.: RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**(21), 2688–2690 (2006)
 62. Liu, K., Raghavan, S., Nelesen, S., Linder, C.R., Warnow, T.: Rapid and accurate large-scale coestimation of sequence alignments and phylogenetic trees. *Science* **324**(5934), 1561–1564 (2009)
 63. Edgar, R.C.: MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 113–113 (2004)
 64. Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reigner, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R., Stadler, P.F., Vogel, J.: The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **464**(7286), 250–255 (2010)
 65. Beckmann, B.M., Burenina, O.Y., Hoch, P.G., Kubareva, E.A., Sharma, C.M., Hartmann, R.K.: In vivo and in vitro analysis of 6S RNA-templated short transcripts in *Bacillus subtilis*. *RNA Biol* **8**(5), 839–849 (2011)
 66. Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H., Stetter, K.O.: *Aquifex pyrophilus* gen. nov., sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System Appl Microbiol* **15**, 340–351 (1992)
 67. Mattatall, N.R., Sanderson, K.E.: *Salmonella typhimurium* LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences. *J Bacteriol* **178**(8), 2272–2278 (1996)
 68. Nicol, J.W., Helt, G.A., Blanchard, S.G., Raja, A., Loraine, A.E.: The integrated genome browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* **25**(20), 2730–2731 (2009)
 69. Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E., Overbeek, R., Snead, M.A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R.A., Short, J.M., Olsen, G.J., Swanson, R.V.: The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**(6674), 353–358 (1998)
 70. Hoffmann, S., Otto, C., Kurtz, S., Sharma, C.M., Khaitovich, P., Vogel, J., Stadler, P.F., Hackermüller, J.: Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures. *PLoS Comput Biol* **5**(9) (2009)
 71. Beckmann, B.M., Grünweller, A., Weber, M.H., Hartmann, R.K.: Northern blot detection of endogenous small RNAs (approximately 14 nt) in bacterial total RNA extracts. *Nucleic Acids Res* **38**(14) (2010)
 72. Reysenbach, A.L., Hamamura, N., Podar, M., Griffiths, E., Ferreira, S., Hochstein, R., Heidelberg, J., Johnson, J., Mead, D., Pohorille, A., Sarmiento, M., Schweighofer, K., Seshadri, R., Voytek, M.A.: Complete and draft genome sequences of six members of the Aquificales. *J Bacteriol* **191**(6), 1992–1993 (2009)
 73. Gupta, R.S., Lali, R.: Molecular signatures for the phylum Aquificae and its different clades: proposal for division of the phylum Aquificae into the emended order Aquificales, containing the families Aquificaceae and Hydrogenothermaceae, and a new order Desulfurobacteriales ord. nov., containing the family Desulfurobacteriaceae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**(3), 349–368 (2013)
 74. Nakagawa, S., Nakamura, S., Inagaki, F., Takai, K., Shirai, N., Sako, Y.: *Hydrogenivirga caldilitoris* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic, hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from a coastal hydrothermal field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**(Pt 6), 2079–2084 (2004)
 75. Nunoura, T., Miyazaki, M., Suzuki, Y., Takai, K., Horikoshi, K.: *Hydrogenivirga okinawensis* sp. nov., a thermophilic sulfur-oxidizing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**(Pt 3), 676–681 (2008)
 76. Washietl, S., Hofacker, I.L., Stadler, P.F.: Fast and reliable prediction of noncoding RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2454–2459 (2005)
 77. Kuratani, M., Ishii, R., Bessho, Y., Fukunaga, R., Sengoku, T., Shirouzu, M., Sekine, S., Yokoyama, S.: Crystal structure of tRNA adenosine deaminase (TadA) from *Aquifex aeolicus*. *J Biol Chem* **280**(16), 16002–16008 (2005)
 78. Kuratani, M., Yoshikawa, Y., Bessho, Y., Higashijima, K., Ishii, T., Shibata, R., Takahashi, S., Yutani, K., Yokoyama, S.: Structural basis of the initial binding of tRNA(Ile) lysidine synthetase TilS with ATP and L-lysine. *Structure* **15**(12), 1642–1653 (2007)
 79. Soma, A., Ikeuchi, Y., Kanemasa, S., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Ote, T., Kato, J., Watanabe, K., Sekine, Y., Suzuki, T.: An RNA-modifying enzyme that governs both the codon and amino acid specificities of isoleucine tRNA. *Mol Cell* **12**(3), 689–698 (2003)
 80. Muramatsu, T., Nishikawa, K., Nemoto, F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T., Yokoyama, S.: Codon and amino-acid specificities of a transfer RNA are both converted by a single post-transcriptional modification. *Nature* **336**(6195), 179–181 (1988)
 81. Muramatsu, T., Yokoyama, S., Horie, N., Matsuda, A., Ueda, T., Yamaizumi, Z., Kuchino, Y., Nishimura, S., Miyazawa, T.: A novel lysine-substituted nucleoside in the first position of the anticodon of minor isoleucine tRNA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**(19), 9261–9267 (1988)
 82. Voorhees, R.M., Mandal, D., Neubauer, C., Köhrer, C., RajBhandary, U.L., Ramakrishnan, V.: The structural basis for specific decoding of AUA by isoleucine tRNA on the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **20**(5), 641–643 (2013)
 83. Marszałkowski, M., Teune, J.H., Steger, G., Hartmann, R.K., Willkomm, D.K.: Thermostable RNase P RNAs lacking P18 identified in the Aquificales. *RNA* **12**(11), 1915–1921 (2006)
 84. Willkomm, D.K., Minnerup, J., Hüttenhofer, A., Hartmann, R.K.: Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Res* **33**(6), 1949–1960 (2005)
 85. Marszałkowski, M., Willkomm, D.K., Hartmann, R.K.: 5'-end maturation of tRNA in *Aquifex aeolicus*. *Biol Chem* **389**(4), 395–403 (2008)
 86. Marszałkowski, M., Willkomm, D.K., Hartmann, R.K.: Structural basis of a ribozyme's thermostability: P1-L9 interdomain interaction in RNase P RNA. *RNA* **14**(1), 127–133 (2008)
 87. Trotochaud, A.E., Wassarman, K.M.: A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* **12**(4), 313–319 (2005)
 88. Barrick, J.E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W.L., Breaker, R.R.: 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* **11**(5), 774–784 (2005)
 89. Beckmann, B.M., Hoch, P.G., Marz, M., Willkomm, D.K., Salas, M., Hartmann, R.K.: A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* **31**(7), 1727–1738 (2012)
 90. Wassarman, K.M., Saecker, R.M.: Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* **314**(5805), 1601–1603 (2006)
 91. Neusser, T., Gildehaus, N., Wurm, R., Wagner, R.: Studies on the expression of 6S RNA from *E. coli*: involvement of regulators important for stress and growth adaptation. *Biol Chem* **389**(3), 285–297 (2008)
 92. Gildehaus, N., Neusser, T., Wurm, R., Wagner, R.: Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. *Nucleic Acids Res* **35**(6), 1885–1896 (2007)
 93. Karzai, A.W., Roche, E.D., Sauer, R.T.: The SsrA-SmpB system for

- protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. *Nat Struct Biol* **7**(6), 449–455 (2000)
94. Tanner, D.R., Dewey, J.D., Miller, M.R., Buskirk, A.R.: Genetic analysis of the structure and function of transfer messenger RNA pseudoknot 1. *J Biol Chem* **281**(15), 10561–10566 (2006)
 95. Zwieb, C., Gorodkin, J., Knudsen, B., Burks, J., Wower, J.: tmRDB (tmRNA database). *Nucleic Acids Res* **31**(1), 446–447 (2003)
 96. Horvath, P., Barrangou, R.: CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**(5962), 167–170 (2010)
 97. Maaty, W.S., Ortmann, A.C., Dlakić, M., Schulstad, K., Hilmer, J.K., Liepold, L., Weidenheft, B., Khayat, R., Douglas, T., Young, M.J., Bothner, B.: Characterization of the archaeal thermophile *Sulfolobus* turreted icosahedral virus validates an evolutionary link among double-stranded DNA viruses from all domains of life. *J Virol* **80**(15), 7625–7635 (2006)
 98. Li, Y.W., Yu, L., Zhang, Y.P.: Long-branch attraction" artifact in phylogenetic reconstruction. *Yi Chuan* **29**(6), 659–667 (2007)

7.5 Deep Sequencing (RNA-Seq)-Datenauswertung

Die Auswertung von Sequenzierungsdaten einer Illumina- (Solexa) RNA-Seq-Analyse von partiell aufgereinigten und auf RNase P-Aktivität angereicherten RNA-Extrakten von *A. aeolicus* wurde in Kooperation mit Dr. Marcus Lechner, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Details zu den sequenzierten Proben und deren Vorbehandlung sind in 4.5.1 beschrieben.

Report: Candidates for RNaseP RNA regarding deep sequencing in *Aquifex aeolicus*

Marcus Lechner

2014-01-23

Data

Sequencing data sources

- Sample A:
 - ID-001587-Probe_A
 - active
 - filtered but not specifically enriched
- Sample B:
 - ID-001588-Probe_B
 - active
 - filtered and specifically enriched
- Baseline:
 - baae2 project, minus library
 - reads from 2009
 - not filtered at all

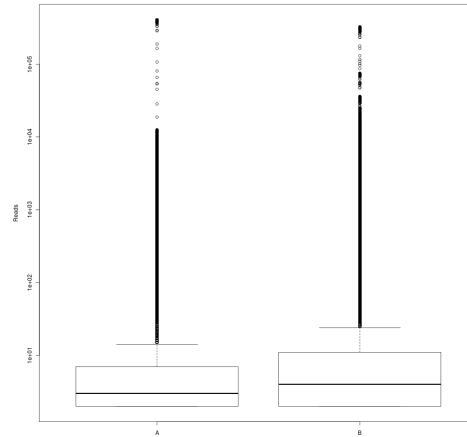


Figure 1: Comparison of read distribution in samples A and B. The median transcription level in B is enriched over A.

Bioinformatic pipeline

- ignore positions with ≤ 10 reads
- ignore read blocks ≤ 150 nt
- compare B vs A and B vs baseline for enriched transcripts in B
- enriched = difference is above median difference
- ignore ribosomal RNA when doing statistics

Results

Candidate n4

- 300 nt (+, 38975..39274)
- intergenic
- enriched vs A
- Aquificaceae hits: 4 (hth,hvi,tal,tru)
- Other Aquificales hits: 3 (pma, saz, ssp)
- somewhat similar sequences found in Epsilonproteobacteria (*Helicobacter*, *Campylobacter*, *Arcobacter*)
- somewhat similar sequences found in Gammaproteobacteria (*Aeromonas*, *Shewanella*)

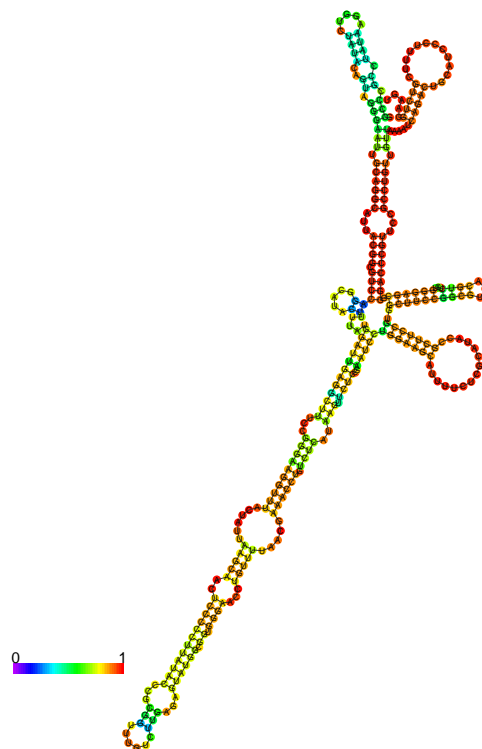


Figure 2: RNAfold of n24 (MFE, bp probability)

Candidate n32

- 203 nt (+, 372922..373124)
- intergenic
- enriched vs A
- Aquificaceae hits: 2 (tru, hvi)
- Other Aquificales hits: 0
- roughly similar sequences found in Firmicutes (*Paenibacillus*, *Thermicola*, *Bacillus*)

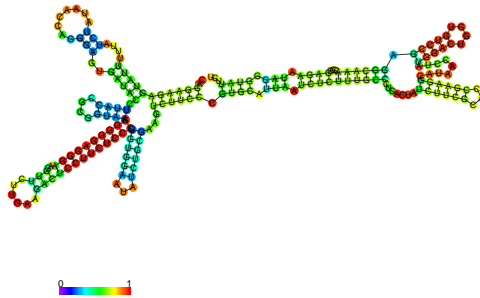


Figure 3: RNAfold of n32 (MFE, bp probability)

Candidate n78

- 226 nt (+, 1219678..1219903)
- partly covers tRNA synthetase (5')
- highly enriched from baseline from baseline
- Aquificaceae hits: 1 (hvi)
- Other Aquificales hits: 0
- no similar hits found in other Bacteria

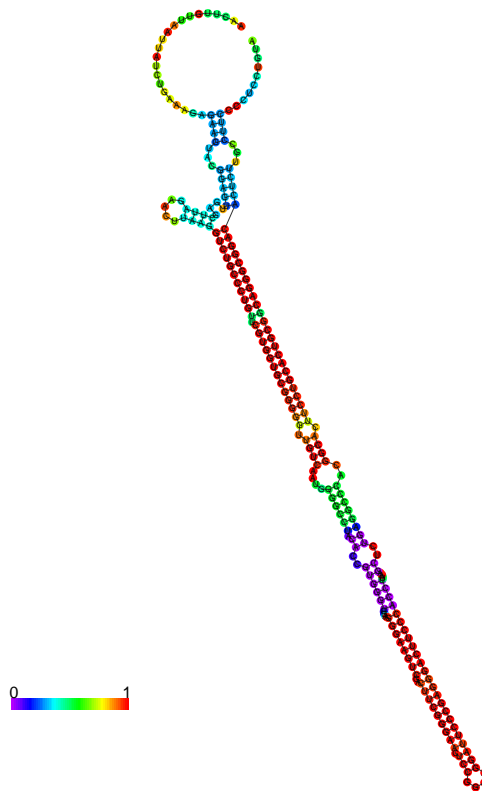


Figure 4: RNAfold of n78 (MFE, bp probability)

Candidate unk1

- 187 nt (+, 144716..144902)
- covered by CDS (flavocytochrome C sulfide dehydrogenase)
- enriched vs A and vs baseline
- Aquificaceae hits: 2 (hth, hvi, tal)
- Other Aquificales hits: 1 (saz)
- no similar hits found in other Bacteria

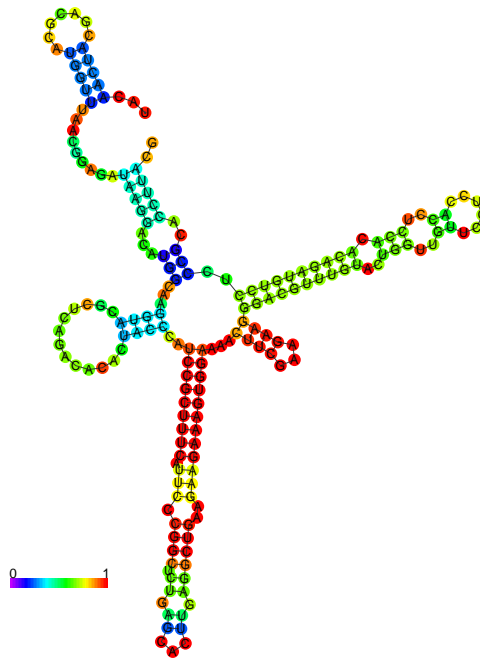


Figure 5: RNAfold of unk1 (MFE, bp probability)

Candidate unk2

- 155 nt (+, 347468..347623)
- covered by two CDS (UDP-N-acetoenolpyruvoylglucosamine reductase and hypothetical protein)
- enriched vs A and vs baseline
- Aquificaceae hits: 4 (hth, hvi, tal, tru)
- Other Aquificales hits: 0
- no similar hits found in other Bacteria

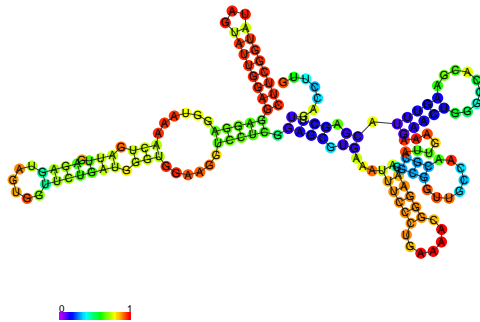


Figure 6: RNAfold of unk2 (MFE, bp probability)

Candidate unk3

- 154 nt (-, 489842..489995)
- intergenic
- enriched vs baseline
- Aquificaceae hits: 3 (hth, hvi, tal)
- Other Aquificales hits: 1 (dth)
- about 12 copies in tal and 2 copies in hth
- no similar hits found in other Bacteria

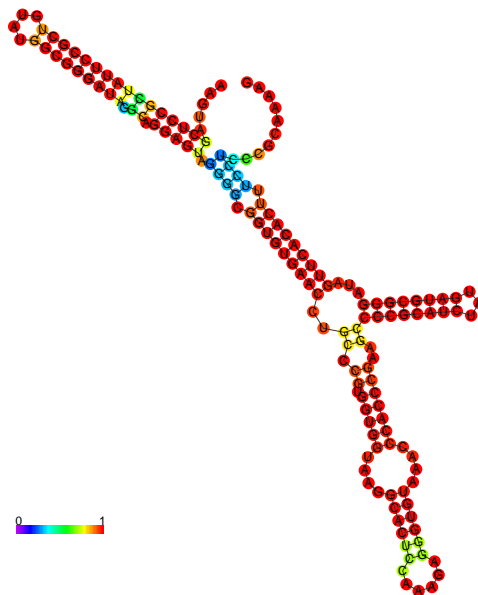


Figure 7: RNAfold of unk3 (MFE, bp probability)

7.6 Massenspektrometrie-Datenanalyse

Die quantitative Auswertung der massenspektrometrischen Daten analysierter *A. aeolicus*-Fraktionen sowie die Proteinanalyse wurden ebenfalls in Kooperation mit Dr. Marcus Lechner, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt. Details zu den analysierten Proben und deren Vorbehandlung sind in 4.7.1 beschrieben.

Mass spectrometry results

Marcus Lechner

2014-02-25

Methods

Peptide Spectrum Matches ($\sum \#PSM$) were used to approximate protein concentrations in samples. Fraction descriptions can be found in Figure 1. Average # peptides was used to approximate certainty for the identification of the respective protein. The value was calculated with respect to active, increasing and decreasing fractions only. Fractions for which the protein was not detected were not included in averaging (no 0 values). Proteins with an average # peptides below 1.25 were discarded. Plots done using R.

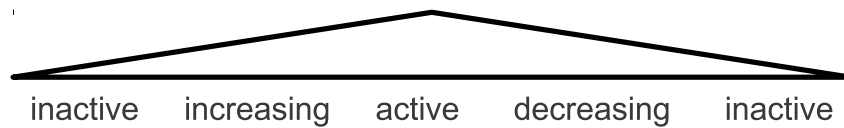
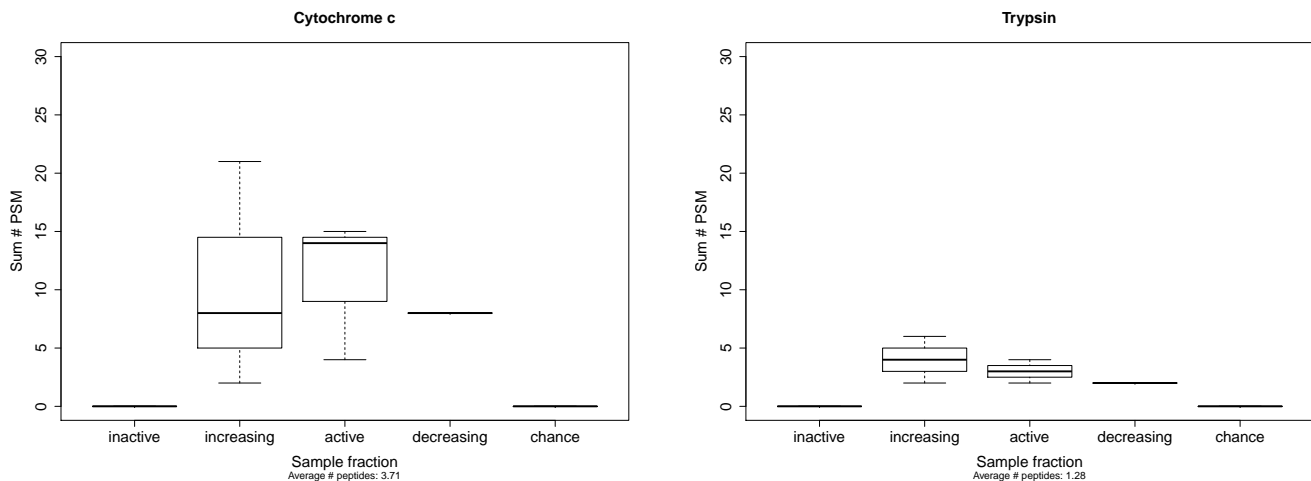


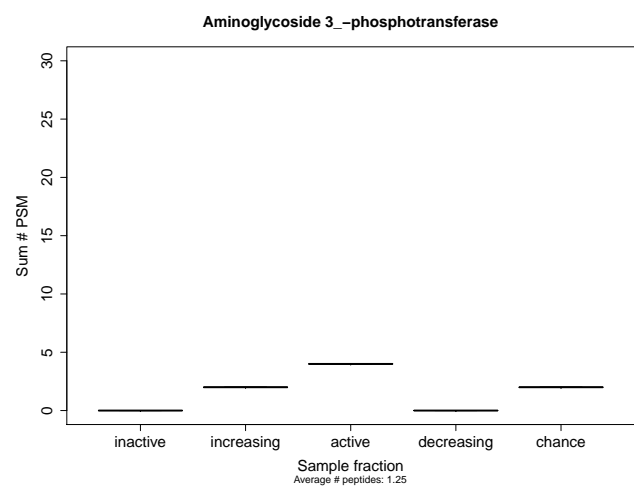
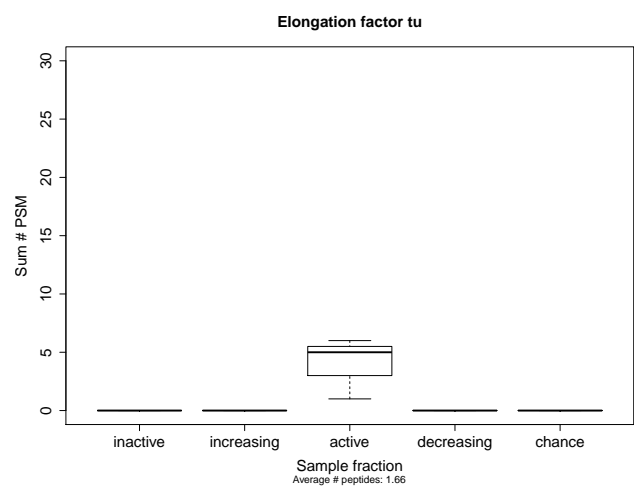
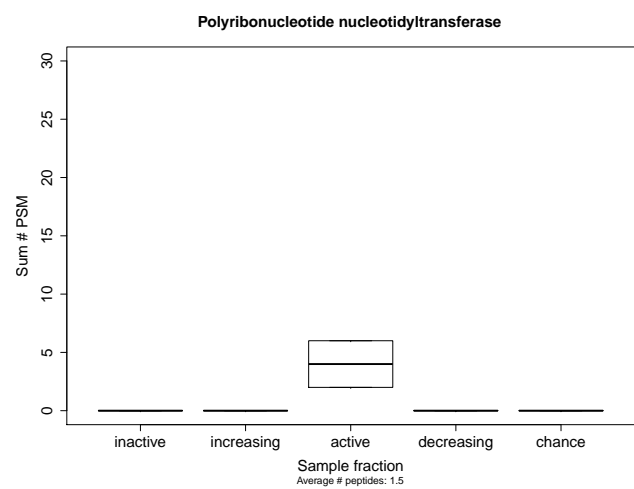
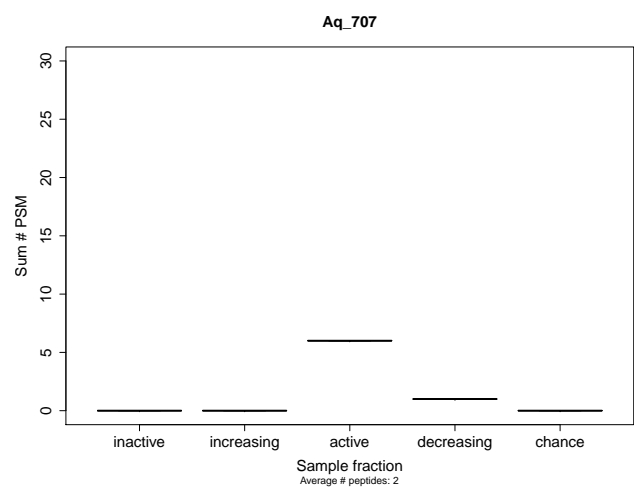
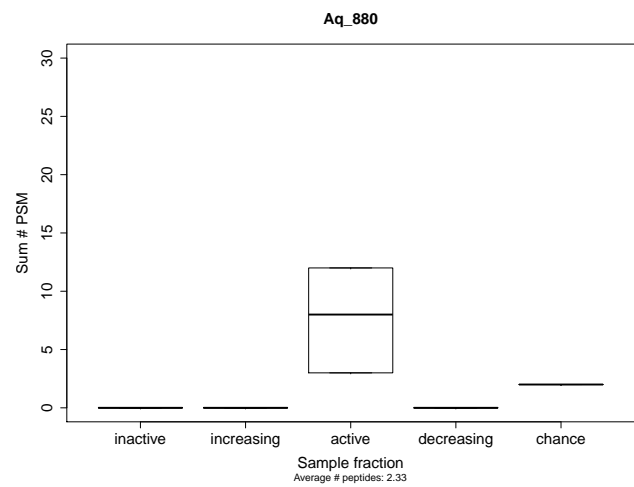
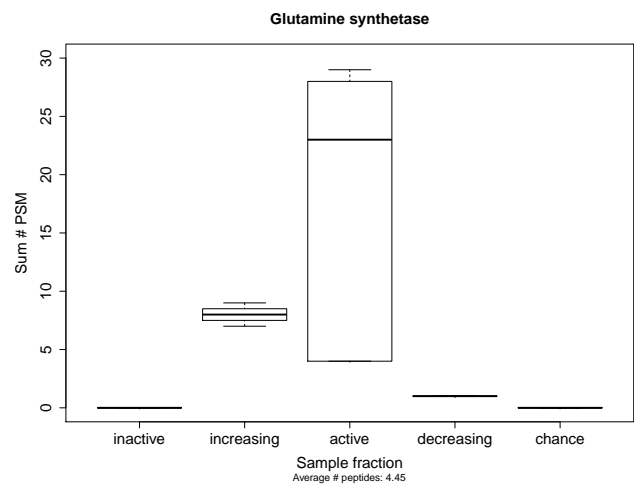
Figure 1: Explanation of sample fractions by activity. Chance was a random set with slight activity.

Comparative plots

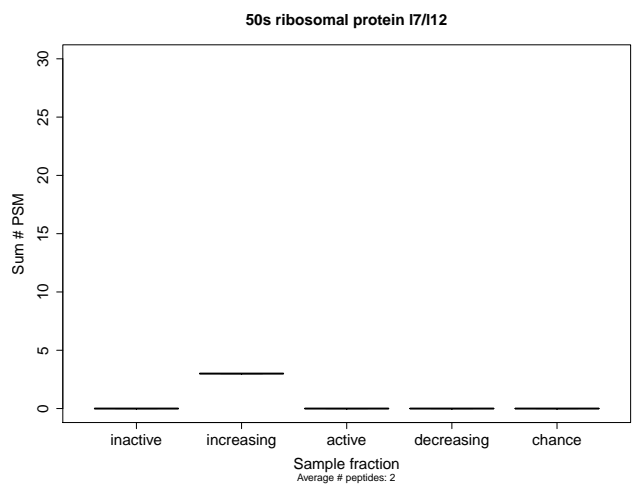
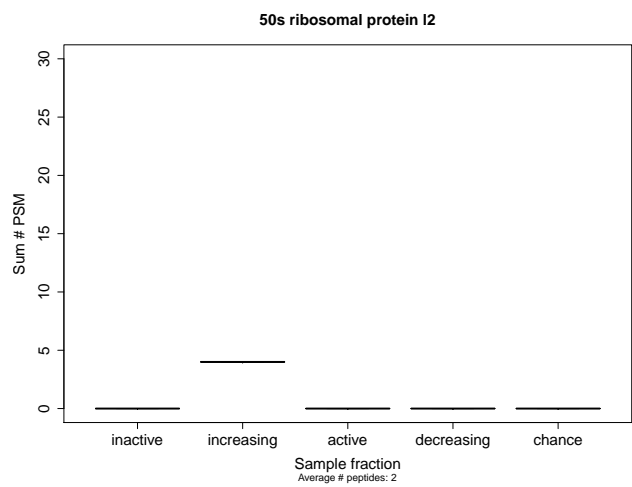
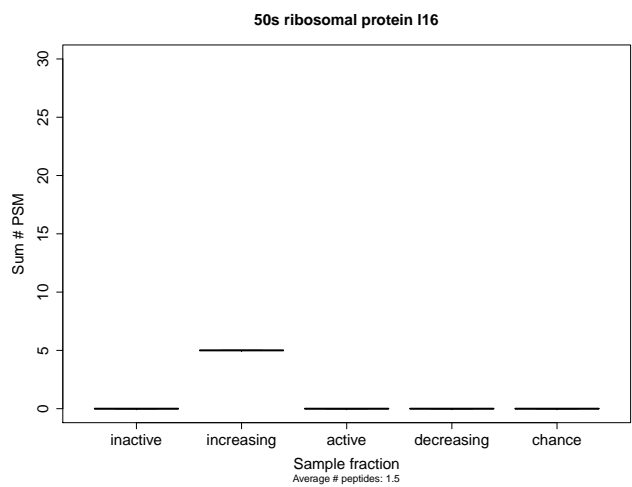
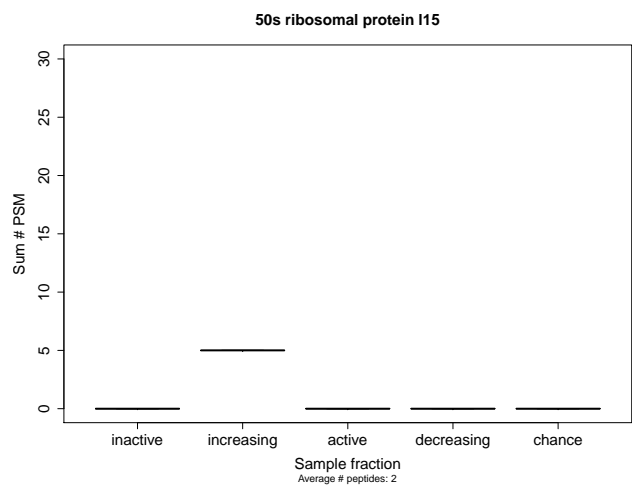
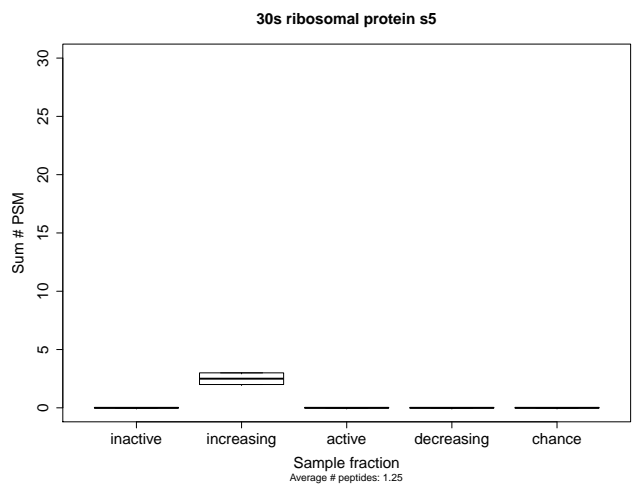
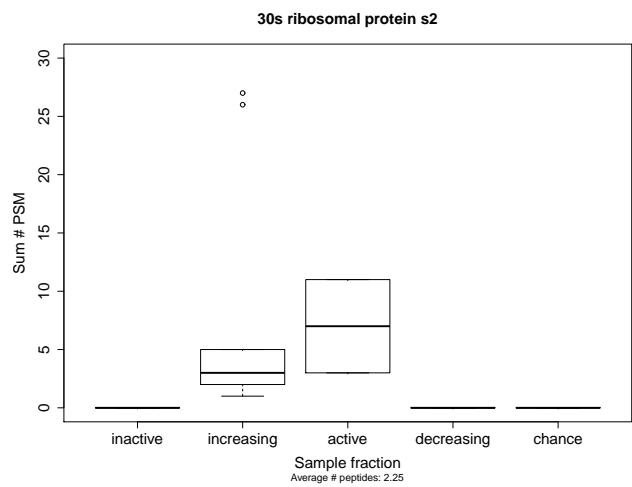
References / Additions



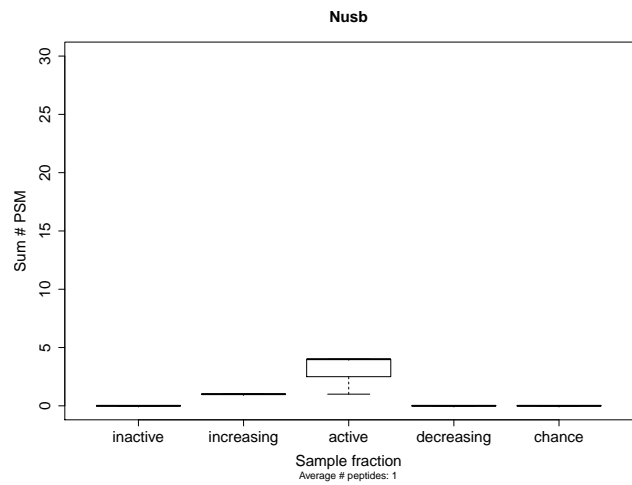
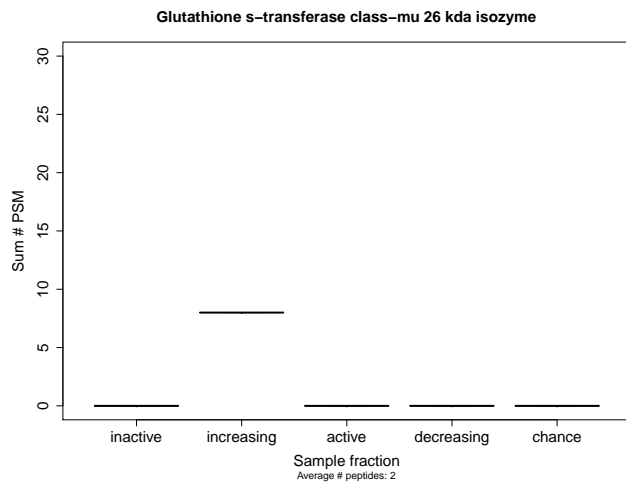
Highest accordance



Ribosomal proteins



Insignificant accordance



Results

Overview

The most significant effects were determined for

- Glutamine synthetase / glnA (*Aquifex aeolicus* VF5)
- Aq 880 / aq_880 (*Aquifex aeolicus* VF5)
- 30s ribosomal protein S2 / rpsB (*Aquifex aeolicus* VF5)
→ Probably a random side effect. Ribosomal proteins are over-represented.

Less significant effects could be obtained for

- Aq 707 / aq_707 (*Aquifex aeolicus* VF5)
- Polyribonucleotide nucleotidyltransferase / pnp (*Aquifex aeolicus* VF5)
- Elongation factor tu, Elongation factor tu 1 / tuf1
(*Ochrobactrum anthropi* CTS-325, *Sodalis glossinidius* str. 'morsitans', *Escherichia coli* O1:K1)
- Aminoglycoside-3'-O-phosphotransferase, Aminoglycoside 3'-phosphotransferase / neo
(*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*)
- N utilization substance protein B homolog, transcription antitermination protein NusB / nusB
(*Aquifex aeolicus* VF5)

Protein sequences can be obtained from supplemental file RESULT_PROTEINS.FAA¹.

¹taken from NCBI)

Presence within *Aquificales*

tblastn with an e-value threshold of $1e - 05$:

Group	Species	aq_707	aq_880	glnA	nusB	pnp	rpsB	tuf1
Aquificaceae	AAE	x	x	x	x	x	x	x
Aquificaceae	HVI	x	x	x	x	x	x	x
Aquificaceae	HTH	x	x	x	x	x	x	x
Aquificaceae	TAL	x	x	x	x	x	x	x
Aquificaceae	TRU	x	x	x	x	x	x	x
Aquificaceae	HBA		x	x	x	x	x	x
Hydrogenothermaceae	PMA	x		x	x	x	x	x
Hydrogenothermaceae	SAZ	x		x	x	x	x	x
Hydrogenothermaceae	SSP	x		x	x	x	x	x
Desulfurobacteriaceae	TAM			x	x	x	x	x
Desulfurobacteriaceae	DTH			x	x	x	x	x

Presence outside of *Aquificales*

Aq_880 is found with high confidence (bitscore > 200 , e-value $< 1e - 57$) in γ -proteobacteria \rightarrow Chromatiales:

- *Nitrosococcus halophilus* Nc4
- *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707
- *Halorhodospira halophila* SL1
- *Alkalilimnicola ehrlichii* MLHE-1
- *Thioalkalivibrio* sp. K90mix

and with medium confidence (bitscore > 150 , e-value $< 1e - 20$) in Archaea:

- *Thermococcus onnurineus* NA1
- *Pyrococcus* sp. NA2
- *Hyperthermus butylicus* DSM 5456
- *Haloferax mediterranei* ATCC 33500
- *Methanothermus fervidus* DSM 2088
- and many more

Descriptions:

- Predicted DNA-binding protein containing PIN domain, ATP-dependent DNA ligase
- conserved hypothetical protein
- Protein of unknown function UPF0278

Aq_707 is found with medium confidence (bitscore > 150 , e-value $< 1e - 40$) in Bacteria (mainly Cyanobacteria):

- *Rhodothermus marinus* DSM 4252
- *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202
- *Crinalium epipsammum* PCC 9333
- *Oscillatoria nigro-viridis* PCC 7112
- *Trichodesmium erythraeum* IMS101
- *Microcystis aeruginosa* NIES-843 DNA
- and many more

Descriptions:

- FAD dependent oxidoreductase
- glycine oxidase ThiO

See also supplemental file AQ_880_770_FULL_BLAST.TXT.

Sequence alignments

Alignments of Glutamine synthetase and 30S ribosomal protein S2 for the Aquificae can be found in Figures 2 and 3. See also supplemental files GLUT.FAA and S2.FAA.

Structural alignment

The structural alignment of aq_880 vs PRORP1 (PDB 4G23, *A. thaliana*) can be found in Figure 4. The candidate matches structurally the C-terminal region of PRORP1. The structure of aq_707 vs PRORP1 (PDB 4G23, *A. thaliana*) can be found in Figure 5. The candidate does not match PRORP1 structurally.

Conclusion

Aq_880 is the most likely candidate for RNase P activity. It could be located in Aquificaceae only but not in Hydrogenothermaceae or Desulfurobacteriaceae. A pathway for the latter two is known already. A protein component would be expected to be present in Aquificaceae exclusively, even though a specialization of components present in all three families it cannot be ruled out. Homologs to Aq_880 were found in Chromatiales (γ -proteobacteria) and in Archaea. The (predicted) structure somehow matches the PRORP1 C-terminal structure. This could indicate a requirement for additional partners (protein and/or RNA) for RNase P activity.

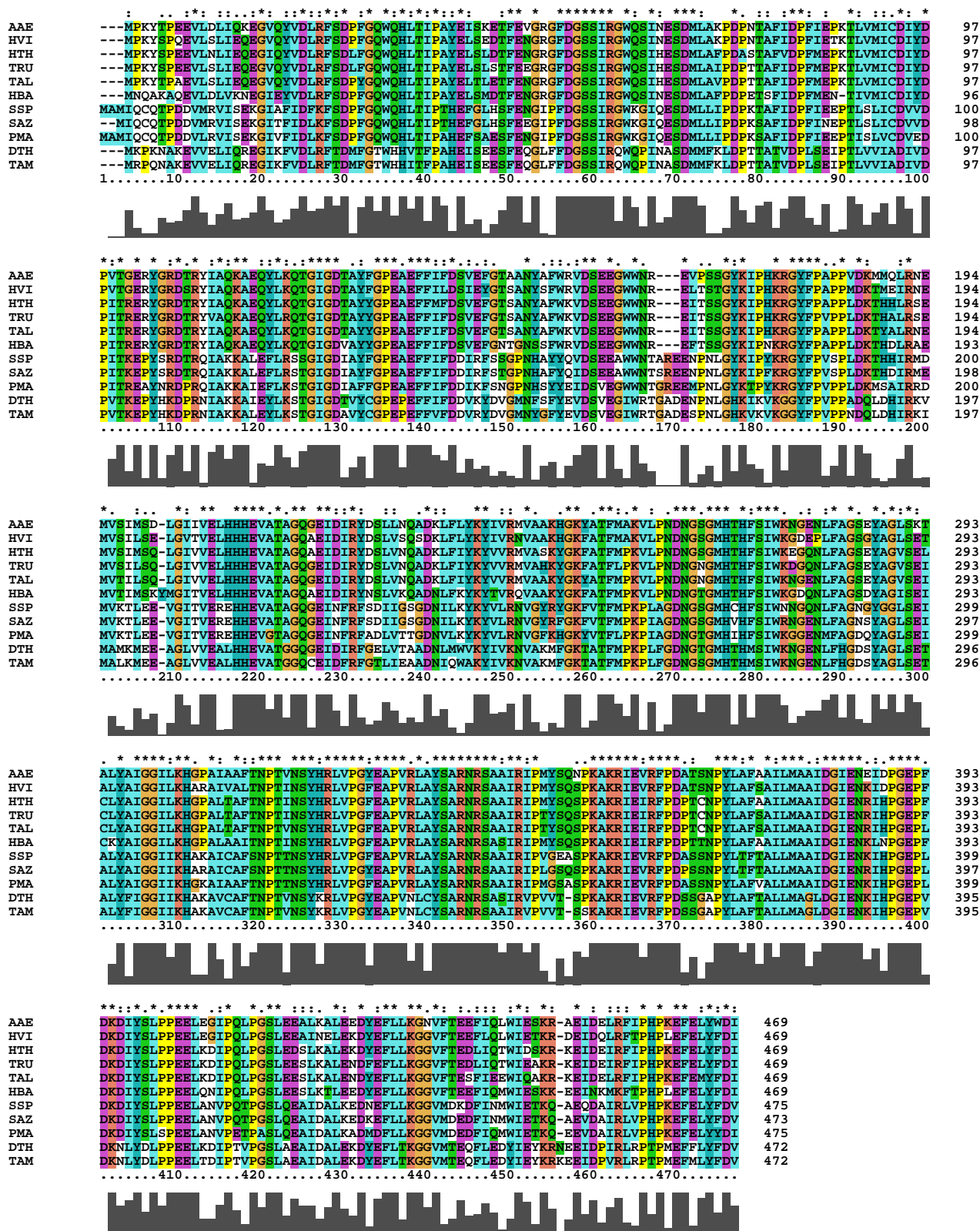


Figure 2: ClustalW alignment of Glutamine synthetase (glnA/glnA-1) in Aquificae (sequences from NCBI). The protein is generally well conserved. This holds especially for its C-terminal region. Clear family-specific sequence features can be determined between Aquificaceae, Hydrogenothermaceae and Desulfurobacteriaceae. Around position 170 a 3 aa deletion was found in Aquificaceae. Around position 457 a 1 aa insertion was found in Desulfurobacteriaceae.

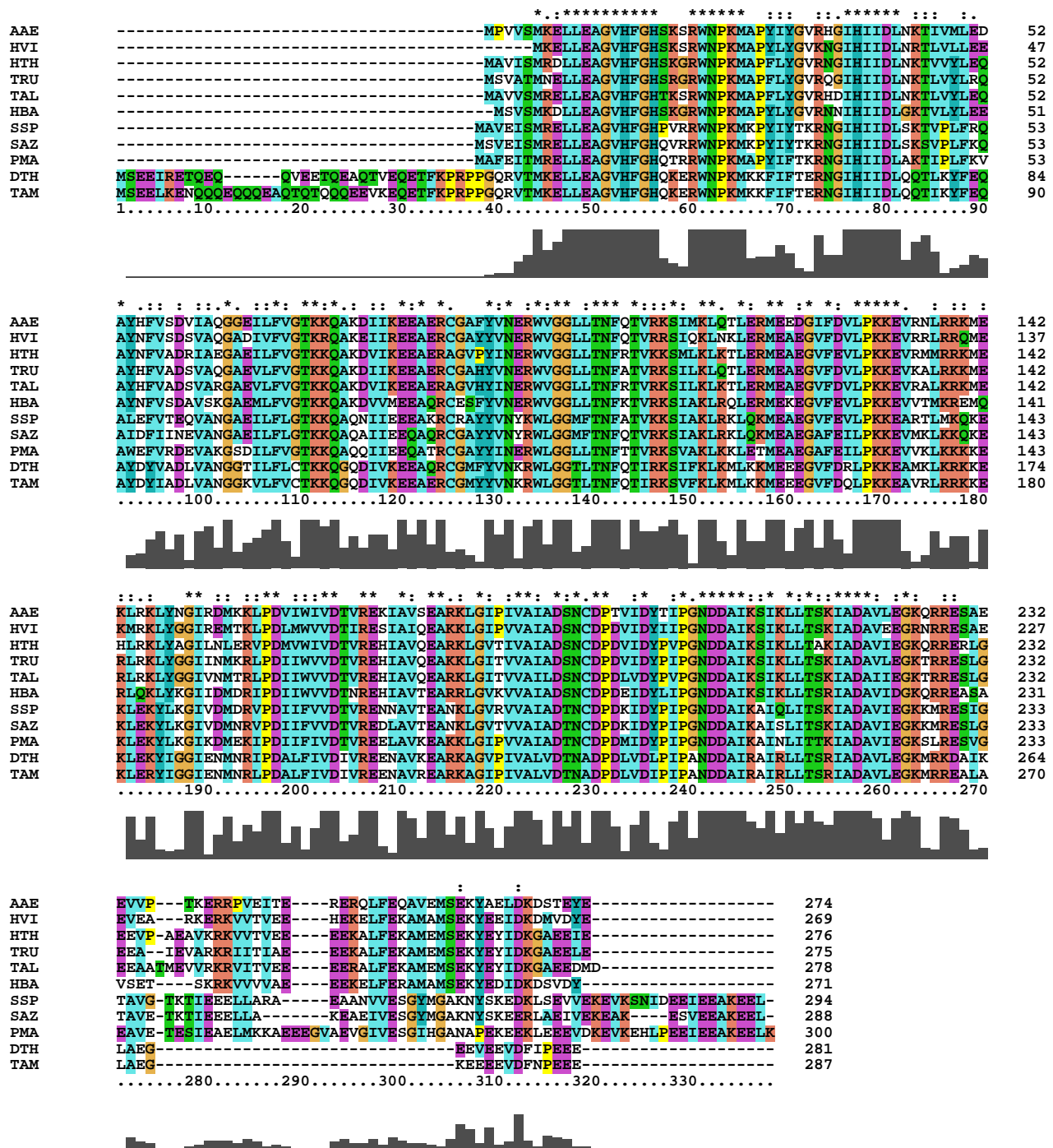


Figure 3: ClustalW alignment of 30S ribosomal protein S2 (rpsB) in Aquificae (sequences from NCBI). The protein is generally well conserved. Desulfurobacteriaceae show a 40 aa long insert in the N-terminal start region whereas a 40 aa deletion can be seen at the C-terminal end. Hydrogenothermaceae on the other hand exhibit an extend C-terminal end (20 aa insert). Major differences can be found at the C-terminal end (starting from position 275). From here, the sequences differ largely in accordance to the species' family.

7.7 2D-Strukturvorhersage einer putativen *A. aeolicus* P RNA

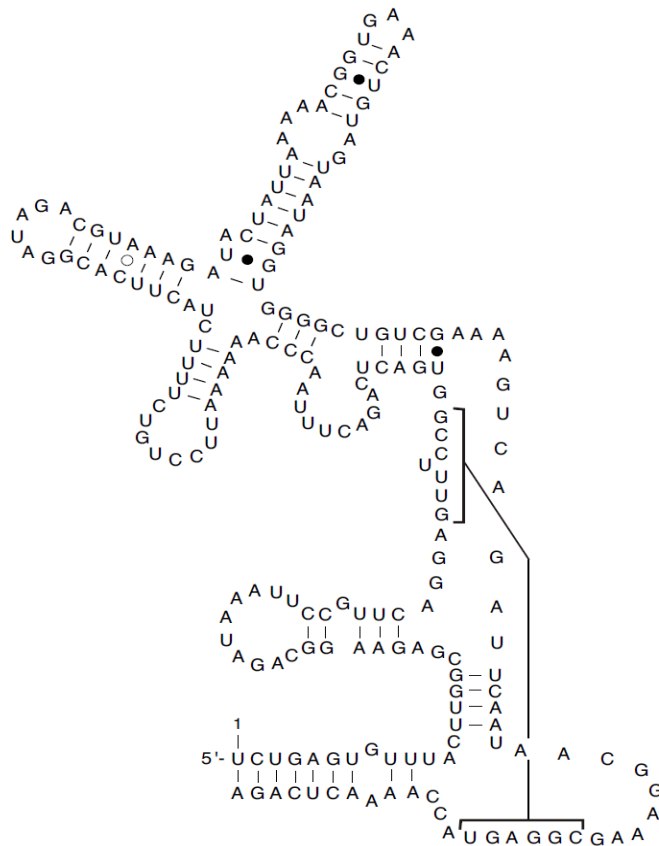


Abbildung 7.1: 2D-Strukturmodell der bioinformatisch identifizierten putativen *A. aeolicus* P RNA (Arbeitsgruppe von Prof. I. Hofacker, Universität Wien). Die Sequenz der putativen RNA wurde entsprechend der universellen RNase P RNA Konsensus-Struktur angepasst.

In der Arbeitsgruppe von Prof. I. Hofacker (Universität Wien) wurde bioinformatisch eine potentielle *A. aeolicus* P RNA identifiziert. Die RNA ist auf dem Genom an Position gi|15282445: 399120 - 399321 kodiert. Die experimentelle Untersuchung der bioinformatisch identifizierten RNA ist in Kapitel 4.6 dieser Arbeit beschrieben.

Danksagung

Mein Dank gilt vielen Freunden, Mitarbeitern und Wegbegleitern.

Im engeren Sinne danke ich:

Prof. Dr. Roland Hartmann dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, auf einem so spannenden Projekt zu arbeiten und meine Doktorarbeit unter seiner Anleitung durchzuführen. Ich danke ihm für sein Vertrauen und die Freiheit bei der experimentellen Gestaltung.

Ich danke Prof. Dr. Walter Rossmanith für seine Funktion als Zweitgutachter.

Prof. Dr. Carsten Culmsee danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission und Prof. Dr. Maike Petersen danke ich für die Teilnahme als Mitglied der Prüfungskommission.

Danke Gabi und Marco, für Eure Hilfsbereitschaft bei unzähligen Aufschlüssen und großartigen ÄKTA-Support.

Desweiteren danke ich Marcus für seine bioinformatische Unterstützung; Katrin für große Hilfsbereitschaft und Unterstützung; Julia für ihren Einsatz an der Superose 6-Säule; Dennis W. für die Bereitstellung von *B. subtilis* Holoenzym; Philipp für Träger-RNA und Grill-Impulse; Dominik und Tanja für Unterstützung bei der Aufreinigung; Dagmar, Kerstin, Arnold und Bene für gute und wichtige Ratschläge und hilfreiche Weisheiten aus ihrem (Labor-) Erfahrungsschatz, sowie allen weiteren Mitarbeitern der AG Hartmann, die mich während meiner Arbeit begleitet haben und sie abwechslungsreich und schön gestaltet haben.

Ich danke Dr. Uwe Linne und den Mitarbeitern der Abteilung Massenspektrometrie des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg für die Analyse vieler Proben, Tipps zur Analyse-Strategie und für Ihre Zeit, mir viele Fragen zu beantworten und Details zu erklären. Konrad Förstner und Jörg Vogel danke ich für die Prozessierung der RNA-Seq-Daten und bei Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff bedanke ich mich für die Leihgabe der Superose 6-Säule.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung

und vor allem danke ich Markus für sein Verständnis, die Unterstützung und den Zusammenhalt auch in den anstrengenden Phasen auf meinem Weg.

Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Aufreinigung und Charakterisierung der RNase P in *Aquifex aeolicus*“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 23.04.2014

.....

Astrid Nickel